

*Universidad Nacional del Nordeste*  
*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura*



*“Análisis de Cocaína y sus Metabolitos,  
en Pelos de Coqueadores del Noroeste Argentino.  
Su Aplicación en Ciencias Forenses  
como Diferenciador entre Coqueros y Adictos”*

*Trabajo de Tesis*  
*Presentado por el Bioquímico*  
*Fernando Galassi para optar al grado de Doctor en Bioquímica*

*Directora de Tesis: Prof. Dra. Leda Gianuzzi*  
*Co-Director de Tesis: Prof. Dr. Mario Raúl Delfino*

2009

*A la memoria de mis Padres;  
y a mis maestros y profesores,  
con mi gratitud por haberme  
enseñado a transitar el camino  
recto de la vida.*

*"Las realidades incomprensibles se han de seguir buscando una vez encontradas. Y no se crea que no ha encontrado nada el que descubre la incomprensibilidad de lo que busca."*

*San Agustín (Carta 131)*

# *Indice*

1- Breve reseña del uso de la hoja de coca entre los pobladores de la región andina	1
2- El arbusto de coca	8
2.1- Sistematización botánica	8
2.2- Distribución geográfica	10
2.3- Química y bioquímica de la coca	11
3. Toxicocinética de la cocaína	15
3.1- Absorción	15
3.2- Bioquímica del coqueo	18
3.3- Distribución	18
3.4- Metabolismo	19
3.5- Eliminación	23
4- El pelo como matriz alternativa para el estudio de drogas de abuso	24
4.1- Anatomía y fisiología del pelo	24
4.2- Componentes morfológicos del pelo	26
4.3- Composición química	27
4.4- El crecimiento del pelo	27
4.5- Velocidad de crecimiento del pelo	28
4.6- Distintos tipos de pelo	30
5- Incorporación y retención de drogas al pelo	33
6- Particularidades analíticas y de interpretación de los resultados del análisis de drogas en pelo	40
6.1- Particularidades analíticas	40
7- El análisis Toxicológico	43
7.1- Toma, conservación y reserva de muestras en el laboratorio de Toxicología	43
7.2- Análisis toxicológico forense	45

7.3- Introducción al Análisis Toxicológico Instrumental	45
7.4- Metodologías de Screening	52
7.5- Inmunoanálisis	55
7.5.1- Los anticuerpos	56
7.5.1.2- Anticuerpos policlonales	57
7.5.1.3- Anticuerpos monoclonales	58
7.5.1.4- Valoración de los anticuerpos	59
7.6- Inmunoanálisis heterogéneos	60
7.6.1- Radioinmunoanálisis	61
7.6.1.1- Aplicación del Radioinmunoanálisis	63
7.7- Metodologías confirmatorias	64
7.7.1- Elección del método analítico	65
7.7.2- Métodos cromatográficos	66
7.7.3- Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)	67
7.7.4- UPLC (Ultraperformance liquid chromatography)	70
7.8- Garantía de calidad	71
7.9- Interpretación de resultados	73
7.10- Esquema general de búsqueda de drogas en pelo	74
7.11- Influencia del tratamiento cosmético	76
8- Aplicaciones del análisis de pelo	77
8.1- Procesos civiles	77
8.2- Procesos criminales	78

## *Objetivos*

1.1- Introducción	79
1.2- Objetivos	80

## *Material y Método*

1- Radioinmunoanálisis	
1.1. Muestras	81
1.2. Reactivos y materiales	83
1.3. Procesado	83
1.4. Aplicación del kit comercial	83
1.5. Método estadístico aplicado	86

2- Materiales y método para la determinación de metabolitos de cocaína: benzoilecgonina, metil ester de ecgonina y cocaetileno en pelo por UPLC	87
2.1- Toma y remisión de muestras de pelo	87
2.2- Descontaminación:	87
2.3- Preparación de la muestra. Extracción de cada uno de los segmentos en forma separada	88
2.4- Instrumental y condiciones de corrida	88
<i>Resultado y Discusión</i>	89
1.1- Puesta a punto de la metodología RIA	89
1.1.2- Análisis estadístico de los resultados	97
1.2- Análisis de cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno en pelo de masticadores de hoja de coca ( <i>Eritroxylum coca</i> )	98
1.2.1- Análisis de cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno en pelo de masticadores de hoja de coca ( <i>Eritroxylum coca</i> ) mediante UPLC-DAD	98
1.2.1- Puesta a punto de la metodología UPLC-DAD	98
1.2.2- Resultados de las muestras de pelo analizadas	101
1.3- Discusión sobre los hallazgos y su comparación con los resultados de Bibliografía	103
1.3.1- Consumidores de cocaína	103
1.3.2- Mascadores de coca	104
1.3.3- Estudios de casos control	105
<i>Conclusiones</i>	108
<i>Agradecimiento</i>	109
<i>Bibliografía</i>	110

# *Introducción*



## **1. El uso de las hojas de coca entre los pobladores de la región andina**

El motivo de esta reseña es hacer referencia al significado que tuvo el uso de las hojas de coca en los habitantes de la región andina en épocas prehispánicas y coloniales, que de una u otra manera condicionaron con fuerza sus costumbres, su cultura, sus mitos, sus creencias que aún se mantienen después de siglos.

Con respecto al estudio botánico de la planta de *Erythroxylon coca*, sus numerosas variedades y formas de cultivo, existe abundante bibliografía, pero a los fines de esta reseña sólo se mencionará a las variedades utilizadas en las época prehispánica y colonial.

Los cronistas españoles de ese momento mencionan dos variedades de coca: una de hojas anchas y gruesas de color verde oscuro en la parte superior y ligeramente amarillenta en su cara inferior, de sabor amargo y alto contenido en cocaína; esta variedad se cultivaba en la vertiente oriental de la cordillera andina en la zona conocida como “ceja de selva” o “montaña”, donde corren los principales afluentes del Amazonas, como ser el Apurímac, el Huallaga, Ucayali, Marayón y otros. La otra variedad cultivada en la vertiente occidental de los Andes o sea sobre el Pacífico, se trata de una especie de hojas pequeñas, de sabor dulce y aromático y con menor porcentaje de cocaína. Con la llegada de los españoles los campos donde se cultivaban estas variedades fueron los primeros en ser abandonados.

María Rotworowsky de Diez Consejo (1973), realizó un exhaustivo trabajo de investigación en documentos consultados en el Archivo General de Indias de Sevilla, y de las Antiguas Crónicas del Perú realizadas por etnobotánicos y especialistas en farmacopea aborigen, que permitieron dar luz a aspectos relacionados al consumo y al cultivo de la *Erythroxylon coca*, ya que los testimonios a cerca del significado que los aborígenes les dieron a las hojas de coca, pueden parecer confusos en un primer momento.

Previo a la dominación incaica por parte de los españoles, el mascar hojas de coca estaba vedado a la gente común y solo las clases aristocráticas tenían este privilegio. Con la conquista española, se difundió y popularizó en forma consuetudinaria y masiva entre los incas el mascar hojas de coca.

arqueológicos se concluye que el uso de las hojas de coca estaba relacionado íntimamente a prácticas rituales

Hay muchos ejemplos al respecto: hace más de 2500 años, en los comienzos de las civilizaciones andinas, en los ajuares funerarios se encontraron hojas de coca como así también se hallaron momias con pequeñas bolsas tejidas que portaban hojas de coca.

También encontramos en las culturas Mochica (300 d.C.) vasijas cerámicas con representaciones en las que se visualiza una ceremonia ritual celebrada por personas de la alta jerarquía, en tanto que un sacerdote guerrero invoca la divinidad y el resto de los personajes observan el acto ritual mascando coca.



*Figura 1*

Otro aspecto que permitirá comprender como la conquista española de Perú contribuyo al hábito de mascar coca, es el siguiente: La hoja de coca tiene reconocidas acciones estimulantes y anoréxicas que generalizo su uso en las regiones andinas mas elevadas.

Las enormes riquezas de oro y plata existentes en el Perú llevaron a un intenso desarrollo de la actividad minera que capto mano de obra indígena para tal fin. Por este motivo decayó la economía incaica, que desde un comienzo fue de naturaleza agrícola perfectamente planificada y altamente desarrollada, característica del Imperio Inca.

El pasó de la economía basada en la agricultura a la minería, provocó falta de alimentos y consigo se extendió por el Perú una importante hambruna. Así lo atestigua Pedro de Gasca, que en 1548 y 1549, informa al Consejo de Indias diciendo que los indígenas devenidos en mineros en su necesidad y desesperación por conseguir alimentos cometían actos vandálicos. Después de dos décadas esta falta de alimento fue una de las causas que provocaron muertes y enfermedades de los indígenas trabajadores de las minas, no obstante que el Virrey Cañete intento sin éxito reactivar infructuosamente la agricultura.

La desnutrición de la población no constituyo un freno en las actividades de los trabajadores de las minas y sucede entonces que se extiende el consumo de hojas de coca, para “calmar el hambre y la sed”, así lo expresaban los indios cuando los cronistas le preguntaban el porque de esa costumbre; vemos así que la hoja de coca ya no interviene en los actos rituales, sino que el pueblo en general la consume aprovechando sus propiedades nutritivas y estimulantes.

Sin duda que la vida de los conquistadores en los altiplanos andinos, fue dura por la propias condiciones ambientales; sorprendidos de la resistencia de la población nativa, pensaron que la planta de coca era lo mas extraordinario del nuevo mundo.

Se origina así dos corrientes de pensamiento distintas: por un lado los misioneros preocupados por la intervención del uso de la coca en actos rituales paganos que interferían en los procesos de cristianización, y por otro lado la actitud de los conquistadores que fomentaban el cultivo y uso de la coca, a la que ya le asignaban propiedades nutritivas y estimulantes.

Aparecen de este modo los abolicionistas, que en 1567-68 aconsejan al Segundo Consejo de Lima, que los Reyes de España y los Oficiales del Rey restrinjan el uso de la coca; mientras que por otro lado los conquistadores propiciaban sus cultivos, aduciendo las propiedades que le asignaban a las hojas de coca, y que por medio de las costumbres de mascarlas conseguirían aumentar el rendimiento de los indígenas que trabajaban en las minas y al mismo tiempo solucionarían los problemas causados por la hambruna generalizada.

De todos modos los misioneros no tenían unidad de pensamiento con respecto a las propiedades de esta planta; en una cosa coincidían la mayoría: gran

preocupación por las condiciones físicas de los trabajadores, también llamados “camayos”.

Teniendo en cuenta que las condiciones ambientales de calor y humedad características del clima de la vertiente oriental de los andes, es propicia para el desarrollo de muchas enfermedades en los indios provenientes de zonas serranas; por esta causa al ser trasladados a las plantaciones de coca, padecían frecuentes enfermedades que a su vez producían cuantiosas muertes.

Entre los misioneros que tuvo una participación notable en la lucha por el mejoramiento de la calidad de vida y de las condiciones de trabajo de los indígenas se destaca Fray Bartolomé de las Casas, quien al mismo tiempo defendía el consumo de coca por considerarla una verdadera sustancia nutritiva y estimulante para los mineros.

Se plantean así dos situaciones: la de los abolicionistas y la de los defensores de los plantadores de coca y la de los mineros; el vocero de estos últimos Licenciado Juan Matienzo, pone en conocimiento del Rey Felipe II de las nefastas consecuencias que se producirían en el Perú si daba lugar a la petición de los abolicionistas; en rechazo de la posición que, la coca era una invención diabólica, él subrayaba que era “una dádiva divina que tenía por objeto mitigar el hambre y la sed, ansia, anhelo en mantener a los indios con calor en el frío clima de los andes y darles la necesaria entereza para su trabajo en las minas”, agregando para dar mayor énfasis a sus argumentos que también conservaba la dentadura de los indios que practicaban el mascado de las hojas de coca..

Ante esta dos situaciones el Rey tomó la posición de permitir el cultivo y consumo de coca, pero bajo ciertas condiciones: el decreto dado a conocer por La Corona y el Virrey Toledo, establecía una legislación protectora para los “camayos”, en ella se consideraba inhumano prohibir el uso de la coca en las sierras, pero no debía ser usada para prácticas idólatras.

A mediados del siglo XVII la costumbre del uso de la coca en la vida socioeconómica de las tierras altas andinas quedó fuertemente institucionalizada; ya que con el correr del tiempo, los oponentes de la coca aumentaron su tolerancia al comprender las consecuencias económicas que producirían la prohibición del uso de la misma.

La legislación rigió para la capital del Virreinato y en los lugares donde no se necesitaba el uso de hierbas estimulantes, concretamente en la región costera del Perú donde existía disponibilidad de alimentos.

Un dato interesante en mencionar es que existen numerosos registros de La Inquisición, entre los siglos XVII y XVIII en los que se mencionan casos de hechiceros acusados de usar coca en sus ritos y en la preparación de afrodisíacos.

En las poblaciones de las zonas costeras, es evidente que no se arraigó el hábito de mascar coca, ya que los cultivos fueron abandonados en el siglo XVI, quedando las poblaciones serranas como centro de producción y uso de la coca.

Visitantes extranjeros del siglo XIX, testimoniaban que era necesario el uso de coca, como un estimulante indispensable para la vida en la Sierra y el Altiplano.

También en ese siglo se abre un debate en Europa a cerca de las propiedades de la coca. Así por ejemplo Paolo Mantegazza, medico italiano, que vivió muchos años en el Perú resaltaba las cualidades medicinales y estimulante de esa planta, describiéndola como un “verdadero tesoro del nuevo mundo” y un “estimulante por excelencia”. No pensaba así Eduar Poepping, quien en 1836 opinaba que no tenia propiedades nutritivas, pero si acciones semejante al opio aunque sea consumida en pequeñas cantidades.

El decano de los médicos peruanos José Ulloa, proponía su exportación a Estados Unidos y Europa para ser usada por los mineros y trabajadores de las fábricas del siglo XIX y comienzos del siglo XX.

Para terminar quiero resaltar dos conceptos a cerca de la milenaria Hoja de Coca:

Uno expresado por el doctor Carlos Terraza Orellana que dice “durante siglos la coca fue considerada como una planta milagrosa dotada de virtudes extraordinarias, hasta que los occidentales extrajeron de la planta la cocaina, la panacea se transformo en un arma fatal” y por otro lado el mencionado por la Licenciada Nélica Carrio, quien opina que “al descubrirse la cocaina no se altero esencialmente la creencia popular que la coca era un estimulante imprescindible para los habitantes de las Tierras Altas, aun en la opinión de científicos y médicos

peruanos de principios de siglo XX la coca no producía efectos peligrosos. (fotos 1, 2,3,4 y 5)



Foto N° 1



Foto N° 2



Foto N° 3

*En estas fotos se observa venta de hojas de coca en comercios y ferias en las ciudades, confirmando el concepto de la profesora Carrió "...no se alteró esencialmente la creencia popular que la coca era un estimulante imprescindible para los habitantes de las tierras altas..."*



*En las fotografías 4 y 5 se observa el uso de infusiones de hojas de coca también llamadas mate de coca.*

Estos dos conceptos reflejan la necesidad de trabajar interdisciplinariamente en el ambiente de las ciencias exactas, medicas, sociales, políticas, jurídicas, para contribuir con la situación de culturas ancestrales, al tiempo de aprovechar las propiedades benéficas de esta planta que al decir de la leyenda Incaica, “el Hijo del Sol, Manco Kápac, fundador del Imperio de los Incas, descendió desde el cielo para posarse sobre las aguas del lago Titicaca y hacerle entrega a los indios de la planta de coca, que consuela al afligido, disminuye el hambre y la sensación de fatiga y cansancio.” *(Foto N° 6)*



*Foto N° 6 “...hacerle entrega a los indios de la planta de coca, que consuela al afligido, disminuye el hambre y la sensación de fatiga y cansancio...”*

## 2 – El arbusto de coca

### 2.1 - Sistematización botánica

El arbusto de coca pertenece al género: *Erythroxylum*, planta tropical de la familia de las erythroxilaceae.

Del género *Erythroxylum* se conoce alrededor de 250 especies, la mayoría de ellas son nativas de los trópicos de América, sin embargo se han hallado especies de este género en África, Madagascar, India, Asia Tropical y Oceanía.

Las dos especies a considerar de este género son: *Erythroxylum coca* Lamarck (foto N° 7) y la *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieronimus, que en décadas pasadas se ha demostrado incontrovertiblemente que son distintas.

A su vez estas dos especies comprenden cada una dos variedades: la *E. coca* var. *coca* (coca Boliviana o Huanuco); la *Erythroxylum coca* var. *ypanu* (coca del Amazonas); la *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense* (coca Colombiana) y la *E. novogranatense* var. *truxillense* (coca de Trujillo).

De todas estas variedades domesticadas, la *Erythroxylum coca* var. *coca*, fue reconocida como la primitiva que dio origen a las otras cuatro.

Por otro lado es importante destacar que las cuatro variedades mencionadas más arriba, son las cultivadas en Sud América, y que contienen el mayor porcentaje de cocaína que otras eritroxilaceae silvestres o semidomesticadas” (Machicao, 1995).



*Foto N° 7 - Erythroxylum coca var. coca (Lamarck)*



En las fotos 8 y 9 se observa la flor y los frutos del *Erythroxylum coca* var. *coca* (Lamarck),



*Foto N° 8 Frutos de Erythroxylum coca var. coca*



*Foto N° 9 Flor de Erythroxylum coca var. coca*

y en la fotografía N° 10 se observan hojas de coca, en donde un detalle importante a tener en cuenta es la presencia de sendas nervaduras ubicadas en forma paralelas a ambos lados de la nervadura central en el envés de la hoja.



*Foto N° 10*

*Hojas de Erythroxylum coca var. coca, donde se observa las nervaduras características de las mismas.*

## **2.2 Distribución geográfica**

La planta de coca crece desde los 200 mts. s.n.m. (coca de Trujillo) hasta los 2000 mts. s.n.m; la Erythroxylum coca var. coca crece en sembradíos por encima del pueblo de Yanacachi (Yungas de La Paz) situada a 1950 mts. s.n.m. (Machicao, 1995) (*Foto N° 11*)



*Foto N° 11 - Cultivo de Erythroxylum coca var. coca*

Considerando la Línea del Ecuador la *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense* se desarrolla al Norte de ésta línea y hacia el Sur lo hace la coca var. *coca*. También en el Sur se desarrolla la *Ypadu* y la *Truxillense* que también se desplazan algo hacia el Hemisferio Norte.

La *Erythroxylum coca* var. *coca*, es la cultivada en Bolivia donde las variedades *Erythroxylum* silvestres alcanzan a veinte aproximadamente; pero solo contienen trazas de cocaína. (Machicao,1995)

### 2.3 Química y bioquímica de la coca

Para los fines de este trabajo es importante conocer que se entiende por: “hoja de coca”; que según la Convención Única de 1961 sobre estupefaciente, art. 1 par. 1 la define como:” por *hoja de coca* se entiende la hoja del arbusto de coca, salvo las hojas de las que hayan extraído toda la ecgonina, la cocaína o cuales quiera otros alcaloides de ecgonina”.

En las zonas Andinas se la conoce con varios sinónimos: *cuca* (aymara); *coca* (quechua); *pastraxó* (chiquitano); *ypadu* o *ypado* (amazona); *ayho*; *mollecoca*; *tupacoca* (otras zonas sudamericanas). El nombre de coca fue introducido por los Españoles procedentes del Perú después de la conquista.

De las hojas de *Erythroxylum coca*, Niemann en 1860 aísla lo *cocaína*, que poco tiempo después es introducida en oftalmología para su uso como anestésico local por Koller, y Freud la introdujo a la neurología.

Las propiedades anestésicas demostraron ser notables; pero la administración repetida de este alcaloide permitió observar la presencia de efectos indeseables sobre el músculo cardíaco y particularmente una alarmante estimulación cortical que la llevo al uso actual como droga de abuso con un alto grado de desarrollo de adicción.

Fue el doctor Ring, en Nueva York quien demostró que la cocaína creaba hábitos viciosos: la adicción; lo que obligo a restringir su venta y uso, mediante disposiciones internacionales.

En 1898 se dilucidó la estructura de la cocaína; la cual pertenece a los *alcaloides del grupo del tropano*. (Lores Arnaiz, y colab.,1976)

El *tropano* es un sistema heterocíclico nitrogenado formado por la condensación de un ciclo N-metilpirrolidina y un ciclo N-metilpiperidina

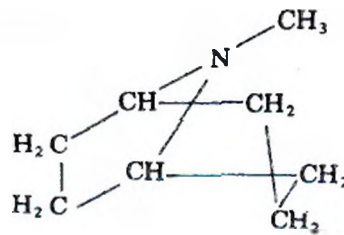
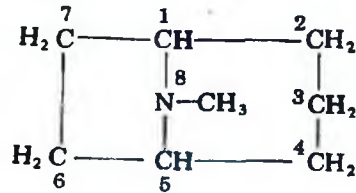


Figura 2 – Estructura del Tropano

La presencia de un oxidrilo en el carbono 3 da origen a dos isómeros:

- a) el *tropanol verdadero* o *transtropanol* (oxidrilo en trans en relación al grupo N-metilo)
- b) el *pseudotropanol* o *cistropanol* (oxidrilo en posición cis en relación al grupo N-metilo.)

La *cocaína* deriva de este último y es el principio activo de la coca, siendo la configuración adoptada para la misma la siguiente:

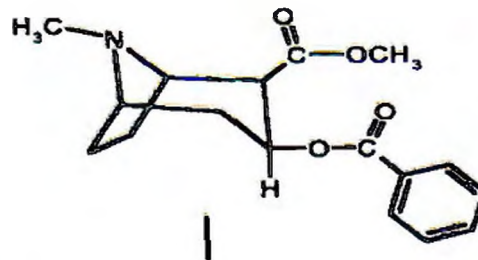
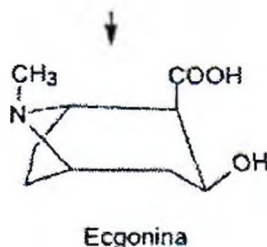


Figura 3 - Estructura de la Cocaína

La cocaína por hidrólisis acida, da metanol, y ácido benzoico y una base llamada la *ecgonina* la que funcionalmente es un amino alcohol desprovisto de acción anestésica.



*Figura 4 – Estructura de la ecgonina*

Los extractos de la hoja de coca de *Erythroxylum coca* (coca colombiana) y de la *Erythroxylum truxillense* (coca Peruana) tienen una concentración de 0,5 al 1,5 % de alcaloides derivados del tropano de este porcentaje más de la mitad corresponde al contenido en cocaína y el resto está formado por

- *cinamil cocaína* (ácido cinámico en lugar de benzoico)
- *alfa y beta truxilinas* (ácido truxílico y truxínico) en lugar de benzoico.
- *tropeinas* (distintos ésteres de la tropococaína)

La *l – cocaína*, una de las diversas formas isómeras posibles, es la que se encuentra en la naturaleza. Se presenta como cristales blancos de PF 96- 98 ° C, poco soluble en agua, mucho más soluble en solvente orgánico. Su solución acuosa es ligeramente alcalina y con sabor amargo (Ver fotografía N° 12)



*Foto N° 12 - Cristales de cocaína*

Es dable mencionar que aparte de los alcaloides derivados del tropano, también se encuentran presente en la coca:

- alcaloides derivados de la **pirrolidina** (higrina, higrolina, cuscohigrina, dihidroscuscohigrina)
- alcaloides derivados de la **piridina** (nicotina) (Novak, et.al. 1984)

### 3 - Toxicocinética de la cocaína

#### 3.1 - Absorción

La forma de consumo de la cocaína puede realizarse de distintas maneras; siendo la más común la insuflación intranasal o inhalarse como un vapor, pero también es frecuente la vía intravenosa o por vía oral

La absorción de la cocaína, se realiza fácilmente a través de cualquier mucosa, no obstante la *vía oral*, no es la más utilizada a causa de las biotransformaciones que ocurren inmediatamente, lo que conlleva a una menor biodisponibilidad, que reduce significativamente su efecto. La concentración máxima en sangre, utilizando esta vía se consigue luego de una hora.

La *vía nasal* es la que se usa en forma mas frecuente, siendo la mas efectiva, ya que por aspiración, el ingreso a la sangre es inmediato a través de los alvéolos pulmonares, y su biodisponibilidad llega casi al 95%, el inconveniente que presenta esta vía es que, la concentración máxima en sangre, que es mucho menor que para otras formas de administración, no se alcanza hasta los 30 min.



*Foto N° 13 – consumo de cocaína por vía intranasal*

Cuando la cocaína es fumada, acción que solamente puede realizarse cuando se usa cocaína base (crack), a causa de que el clorhidrato o sulfato de cocaína son muy sensibles a la acción del calor; y hay que destacar que si bien se alcanza el pico

a los 5 minutos, el rendimiento es variable debido a los parámetros (temperatura, artefactos, velocidad, etc.), que condicionan el acto del fumado. Fumar la cocaína mezclada con tabaco produce concentraciones bajas de cocaína.

Sin duda que la absorción más rápida se realiza por vía endovenosa, a pesar que se nota un leve descenso de su uso a causa de la trasmisión de enfermedades por esta vía.

Si bien al hablar de los *procesos de absorción* nos hemos referido solamente a los estudios realizados en los adictos; es necesario en este punto destacar dos conceptos importantes a saber

- ✓ *Cocainismo* (consumición de cocaína) por una acción adictiva que entraña un daño psicofísico al toxicómano.



*Foto N° 14*

*Consumo de cocaína vía intravenosa*



*Foto N° 15*

*Jeringa usadas para la administración*

✓ *Cocaísmo* es el acto de masticar hojas de coca (coqueo). Se trata de un hábito impuesto por circunstancias variadas: geográficas, místicas, raciales, económicas, etc. y que tienen distintas denominaciones según el país, en Bolivia por ejemplo se la conoce como “acullicar”, en Perú y el sur de Colombia “chabchar” en la Argentina “coquear”.





*Foto N° 16*

*Nativa del altiplano mascando coca*

Es así que *el acullicar* se constituye por si solo en un tema interesante de estudio, por las consiguientes implicancias sociales, religiosas, políticas, fisiológicas, económicas, médicas, etc., que esta práctica conlleva.

Es también de destacar que en la zona del altiplano y en gran parte del noroeste argentino es usual tomar infusiones de hojas de coca (llamada mate de coca en Bolivia) e inclusive se observa la venta de licores de hojas de coca.

*Resumiendo* lo que se pretende significar es que, también el coqueo, el tomar infusión y/o licores de hojas de coca son otras alternativas del ingreso de cocaína y o sus derivados al organismo, que de ninguna manera se la puede interpretar como una adicción.

Al respecto Siegel, R (1986) afirma que la mayor parte de la cocaína puede ser liberada de la hoja de coca por una simple infusión. Llosa, T et al (1993) encontraron en hojas de coca como en sus infusiones benzoilecgonina, ecgoninametilester y transcinamoilcocaína empleando cromatografía gaseosa en el análisis de las mismas.

### 3.2 - Bioquímica del coqueo

En el proceso del coqueo las hojas de coca son resquebrajadas y humedecidas en la cavidad oral en las encías y entre los carrillos (Aulek y Plowman -1975-) (Siegel, R -1980; Machico, E. -1984), y con la adición de un alcalinizante (Burchard, R -1975), la “llipt’a” o “troca” constituida principalmente por carbonatos o bicarbonatos que alcalinizan el medio, permitiendo que los alcaloides derivados de la ecgonina, inclusive la cocaína, en contacto con la mucosa bucal, sean absorbidos pasando directamente al torrente sanguíneo.

Se considera así un sistema de dos compartimentos: la cavidad oral y el torrente sanguíneo separados por la mucosa oral. El pH que lleva la “llipt’a”, adicionado al bolo de hoja de coca, incrementa notablemente el pH de la cavidad bucal hasta aproximadamente once, mientras que el pH del plasma es 7,2 – 7,4. *Esta diferencia de pH establece un gradiente de concentración elevado a favor de los alcaloides con la consiguiente facilitación de la absorción de los mismos* (Castro de la Mata, R. 1980), una pequeña parte de los alcaloides pasa al tracto digestivo (Duke, J. et al -1975; Machico, E -1984) donde son degradados antes de que lleguen a la circulación sanguínea por acción del ácido clorhídrico y las enzimas digestivas (Montesino 1985).

### 3.3 - Distribución

Si consideramos la forma química en la que se encuentra la cocaína, por ejemplo sus sales o la coca base, vemos que difieren notablemente en su solubilidad, las primeras son hidrosolubles y la segunda es liposoluble, de forma que las sales ingresarán al sistema nervioso central en forma lenta y por el contrario la solubilidad de la coca base manifiesta un ingreso y un efecto mucho más rápido a este nivel. Por esta diferencia de solubilidades se explica el hecho de que en la saliva los valores de la sal son mayores que en la sangre.

La vida media de cocaína en sangre es baja de 30 a 120 minutos, mientras que su metabolito benzoilecgonina es de 5 a 7 horas.

Los fenómenos postmortem hacen que la concentración de cocaína siga disminuyendo a expensas de un aumento de benzoilecgonina; mientras que en el

humor vítreo la concentración de cocaína aumenta hasta tres veces y no así la benzoilecgonina.

Es de destacar que la cocaína y sus derivados también ingresan al pelo, matriz analítica que es el eje de este trabajo, motivo por el cual será tratada extensamente más adelante.

### 3.4 - Metabolismo

Una vez que la sustancia ingresa al organismo, la vida media de la misma en sangre es relativamente corta (30 a 120 min), esta circunstancia unida a su gran labilidad resalta la importancia de conocer su metabolismo y los productos que se forman como consecuencia de este proceso, ya que el tiempo de detección de la cocaína como tal es demasiado corto.

En el organismo la biotransformación a ecgonina metilester y ecgonina ocurre por la acción enzimática concretamente de las colinesterasas sérica y hepática. (Inabe, T et.al. 1989) Mientras que en solución acuosa como así también en el organismo la producción de benzoilecgonina se realiza por hidrólisis simple sin intervención de enzimas (Baselt, R. 1983); la pérdida del metilester es un proceso espontáneo que depende solamente del pH y de la temperatura (Chinn, D. M. et. al. 1980). Las colinesterasas pueden convertir la benzoilecgonina a ecgonina enzimáticamente.

En síntesis la cocaína se metaboliza rápidamente, en una gran proporción, por vía enzimática como química, siendo el principal metabolito la **benzoilecgonina (BZE)** seguida del **metilester de ecgonina (EME)**, destacando que la vida media en sangre de la benzoilecgonina es de 7 a 9 horas. Los metabolitos, hasta aquí mencionados, son los más frecuentemente usados, para la detección del consumo de cocaína (ver fig. 4-5).

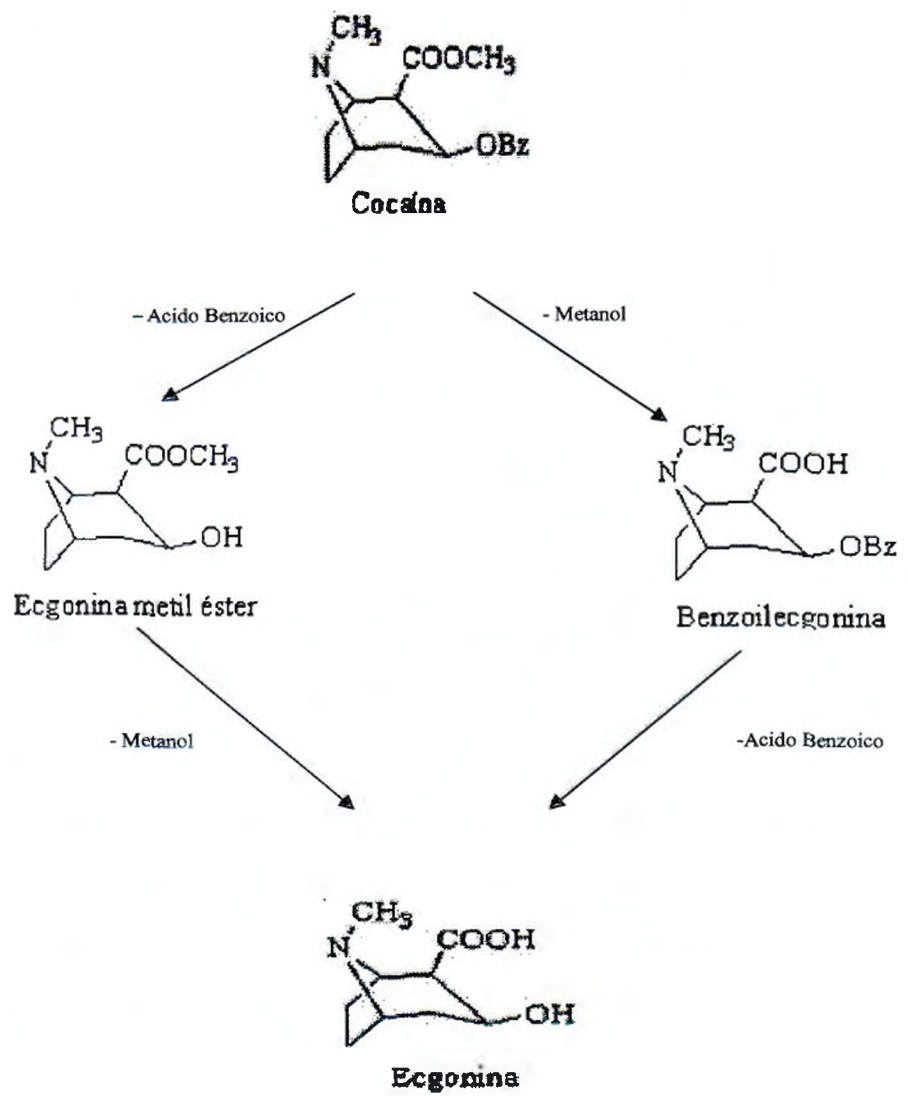


Figura 4 - Biotransformación de la cocaína

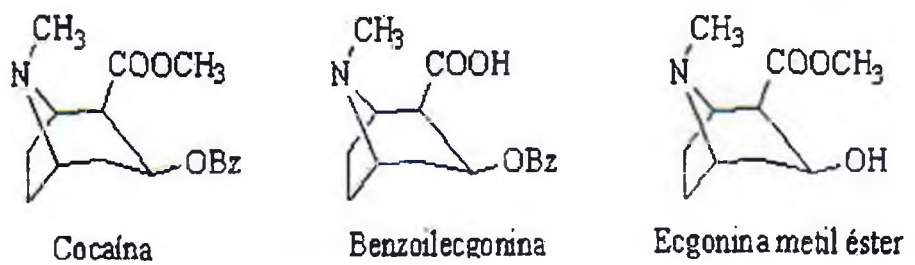
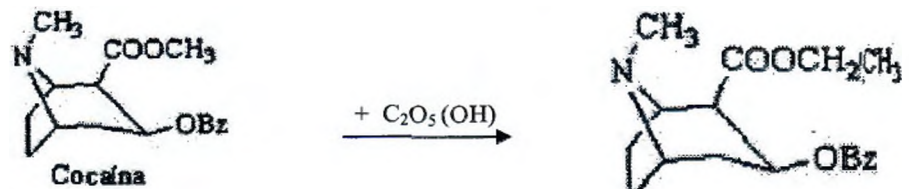


Figura 5 - Principales metabolitos de la cocaína

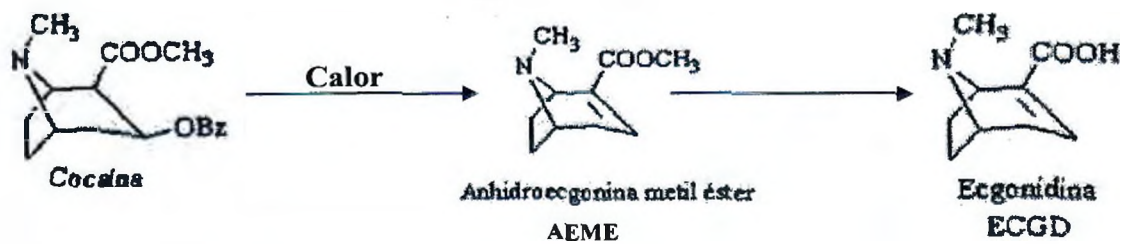
Existen otros metabolitos de interés:

- la **etilenbenzoilecgonina** o **cocaetileno** (EBZE) que se produce por el consumo simultaneo de cocaína u alcohol etílico (Heam, W. et. al. 1991) (Ver Fig. 6)



*Figura 6 - Formación etilenbenzoilecgonina*

- el **éster metílico de la anhidroecgonina** (AEME) y su metabolito la **ecgonidina** (ECGD), aparecen a causa de los procesos de pirrólisis, cuando la cocaína es fumada. (Ver Fig. 7)



*Figura 7 - Productos de Pirrólisis de la cocaína*



*Foto N° 17 – Consumo de cocaína: fumada*

- Es de destacar que se producen otros metabolitos entre ellos los metabolitos **hidroxiarilos** (Smith, R.M. 1984)

### Productos Metabólicos y de Pirrólisis de la Cocaína

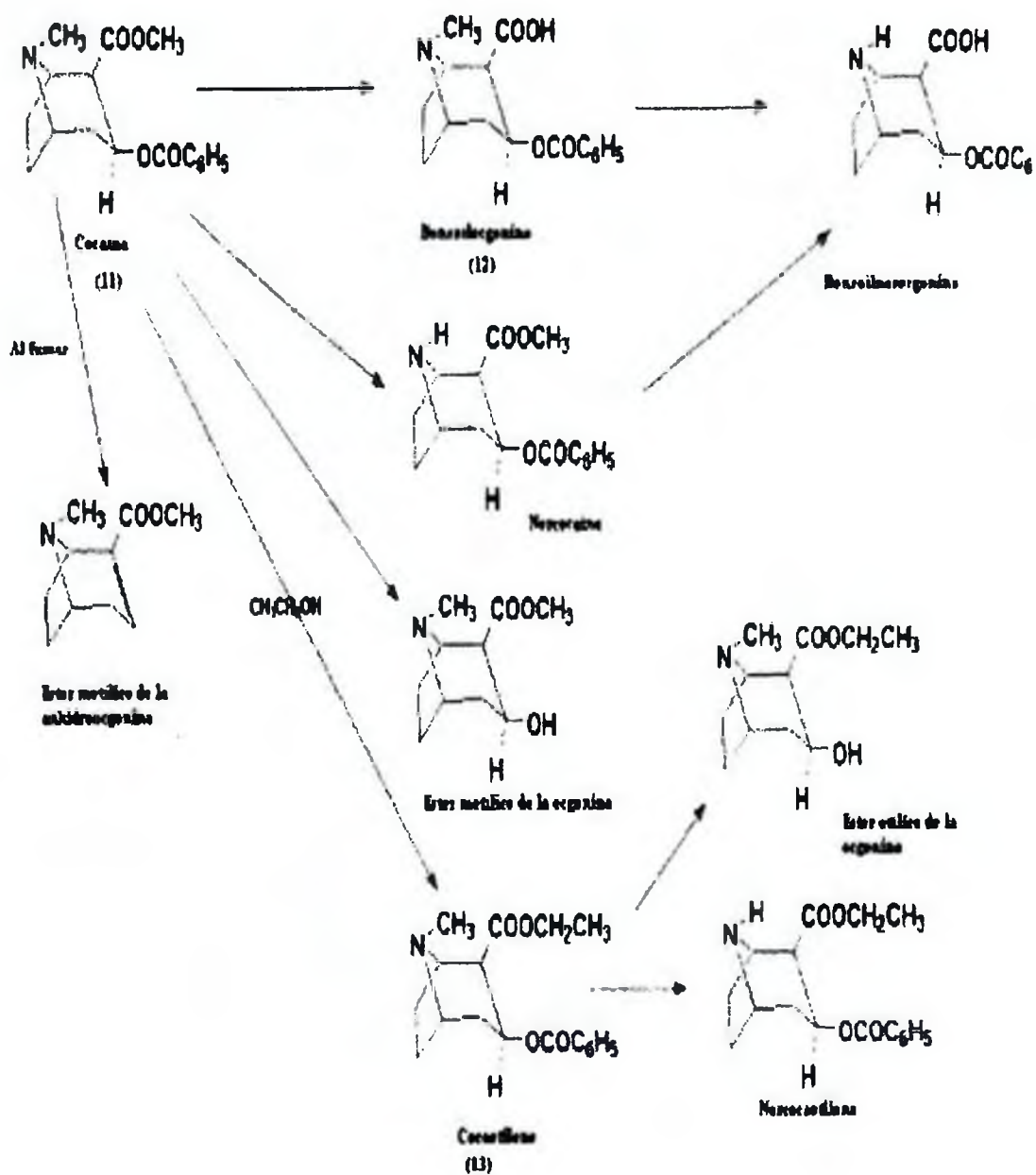


Figura 8

### **3.5 - Eliminación**

Tras el consumo de cocaína la mayor parte es eliminada por la orina siendo la cantidad de cocaína que se excreta de 1 a 9 %, la benzoilecgonina de 35 a 54 % y la del metilester de ecgonina de 32 a 49 % (Repetto 2005), aunque también estas sustancias se encuentran en otras matrices biológicas, entre ellas saliva, sudor y cabellos.

## 4 - El pelo como matriz alternativa para el estudio de drogas de abuso

Históricamente la determinación de drogas de abuso se realizó fundamentalmente en sangre y en orina, aunque también se pudo concretar en distintos fluidos y tejidos biológicos. En la actualidad el uso del pelo como matriz analítica se convirtió en una técnica de rutina, y es usada en toxicología forense para la determinación retrospectiva de drogas ilegales, y también en toxicología clínica para distinguir entre niveles de drogas terapéuticas, sobredosis o dosis por debajo de la terapéutica.

Es así que el pelo como matriz no tradicional se transformó en una alternativa analítica, que de ninguna manera desplaza el uso de sangre y orina, matrices que se dieron en llamar ahora tradicionales sino que se complementaron entre si.

Sin embargo las bases fisiológicas, tanto como el rendimiento analítico de los análisis del pelo son complicadas, y pueden ser fuente de error al tiempo que pueden desvirtuar los resultados.

Es por ello que en este capítulo se desarrollará una actualización y revisión de la anatomía y fisiología del pelo, los procesos de incorporación, fijación y eliminación de las drogas al pelo.

### 4.1 - Anatomía y fisiología del pelo

Al estudiar la anatomía y fisiología del pelo se pueden considerar básicamente tres partes con funciones específicas cada una: *el folículo, las glándulas anexas y una red de capilares sanguíneos.*

El **folículo** se encuentra en el epitelio dérmico a tres o cuatro milímetros por debajo de la superficie de la piel; en un hombre adulto se encuentran entre 80.000 y 1.000.0000 de folículos (Barman 1964); este número decrece con la edad y no se desarrollan nuevos folículos luego del nacimiento (Muller, 1971) (Repetto, 2006).

Harkey (1993), distingue en el folículo tres zonas a lo largo de su eje, las mismas son funcionalmente distintas:



✓ *Una zona mas interna* en y alrededor del bulbo, sitio donde se forman las células que darán origen al pelo

✓ *Una zona media* denominada *zona queratogena* ubicada por encima del bulbo; en este lugar se produce la queratinización del pelo con el consiguiente fortalecimiento y solidificación del mismo

✓ *Una zona final* constituida por el pelo definitivo integrado por células cornificadas y deshidratadas.

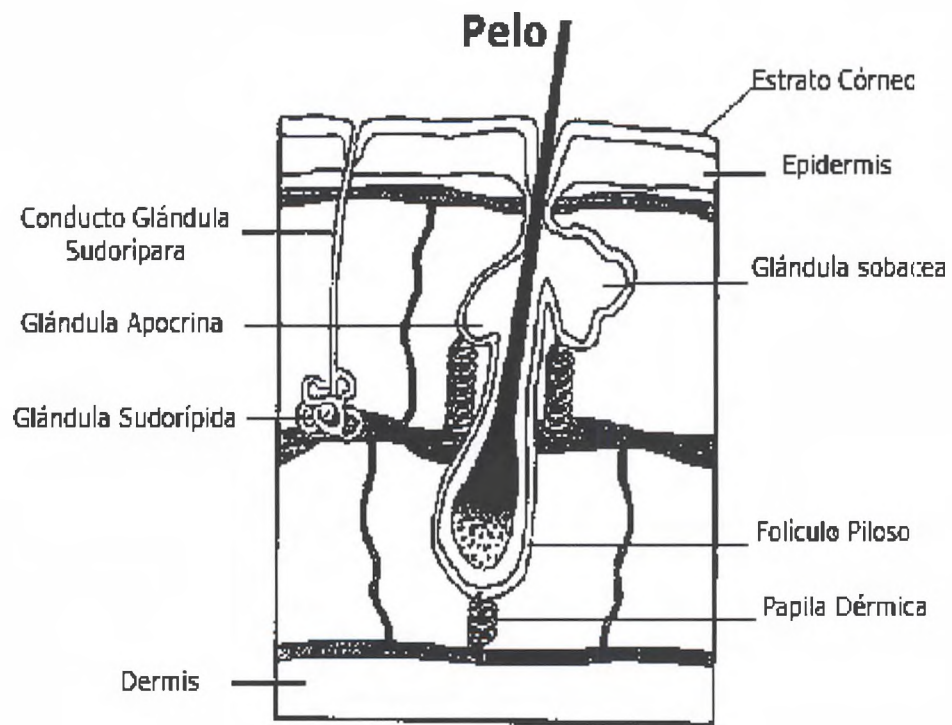
Rodeando al folículo se hallan tres tipos de **glándulas anexas**, las mismas son:

✓ **Glándulas sebáceas** estas derraman sobre el folículo las secreciones sebáceas antes de emerger a la piel. Cabe aclarar que esta situación no se da en los pelos de barba, en ese lugar las secreciones se vuelcan directamente sobre la superficie de la piel a través de conductos que se abren en ese lugar.

✓ **Glándulas apocrinas** estas glándulas vacían sus contenidos directamente al folículo pero se las encuentran en los pelos de los párpados, axilas, conducto auditivo interno y región perineal.

✓ **Glándulas sudoríparas** se originan en la capa dérmica de la piel, pero a diferencia de las anteriores glándulas su secreciones no son derramadas sobre el folículo es decir no están conectadas a el, sino que sus conductos se abren en la piel en las proximidades del lugar donde emerge el pelo, por otro lado su localización se da en toda la superficie corporal.

Por ultimo hay que destacar que el folículo piloso esta rodeado por una profusa red de capilares sanguíneos que junto a las glándulas descriptas tienen una activa participación de las transferencias de drogas al pelo.



*Figura 9 - Diagrama simplificado del folículo piloso (tomado de Harkey, 1993)*

#### 4.2 - Componentes morfológicos del pelo

En el pelo podemos considerar cuatro componentes fundamentales:

- ✓ La capa más externa llamada **cutícula** que cumple funciones de protección y de fijación del pelo al folículo.
- ✓ La zona ubicada por debajo de la cutícula llamada **corteza** siendo esta la porción más gruesa del pelo.
- ✓ La zona central llamada **médula**, esta puede ser continua o intermitente, a veces puede estar ausente, su presencia o ausencia esta subordinada al diámetro del pelo.

### 4.3 - Composición química

Según Repetto, (2005) aproximadamente en la composición química del pelo intervienen:

<i>Proteínas</i>	65 al 95 % (fundamentalmente queratina)
<i>Agua</i>	15 al 35 %
<i>Lípidos</i>	1 al 9 % (proviene de las glándulas sebáceas y apócrinas; siendo los principales ácidos grasos libres, mono, bi y triglicéridos, ésteres de ceras, hidrocarburos y alcoholes).
<i>Minerales</i>	0.25 a 0.95 % en peso seco.

Una sustancia a destacar es **la melanina** pigmento responsable del color del pelo, la misma se encuentra en gránulos y en gran cantidad en la corteza, en menor proporción en la medula y no se hallan en la cutícula. El número de gránulos de melanina, su distribución, su tamaño y disposición determinan el color del pelo.

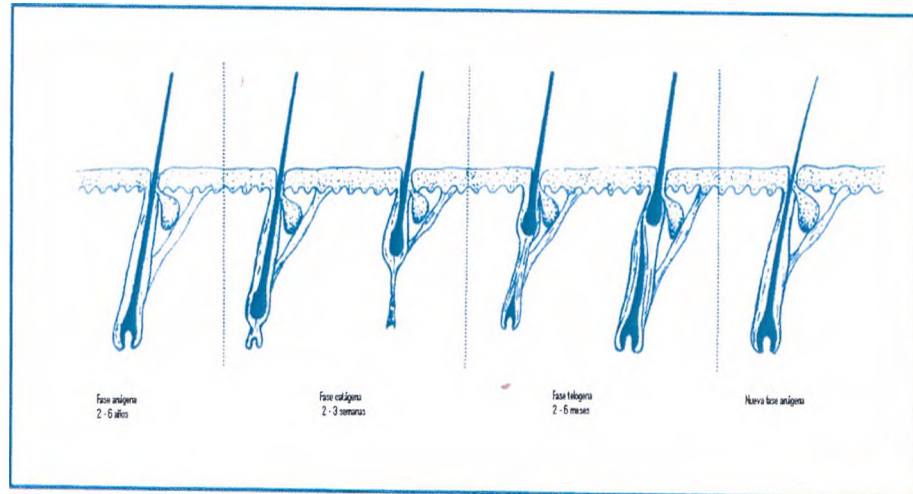
### 4.4 - El crecimiento del pelo

El cabello humano se desarrolla en un círculo de crecimiento que consta de tres etapas:

✓ ***Etapas anágena:*** en la misma se desarrolla una intensa actividad metabólica, en la que el extremo del folículo es empujado profundamente en la dermis a causa de una continua división celular, con la consiguiente formación de un pelo nuevo. Esta etapa anágena también llamada de crecimiento dura de dos a seis años en el cuero cabelludo.

✓ ***Etapas catágena:*** o estado de transición de cerca de tres semanas de duración en la cual el bulbo se deteriora, se detiene la división celular y el pelo comienza a queratinizarse.

✓ **Etapa telógena:** o etapa de reposo de dos a seis meses de duración, el crecimiento del pelo se detiene en esta etapa y es retenido en la parte superior del canal del folículo hasta que es empujado por un nuevo pelo. De esta forma la longitud terminal alcanzada por el pelo esta determinada por la duración del período anágeno y parcialmente por la velocidad del crecimiento.



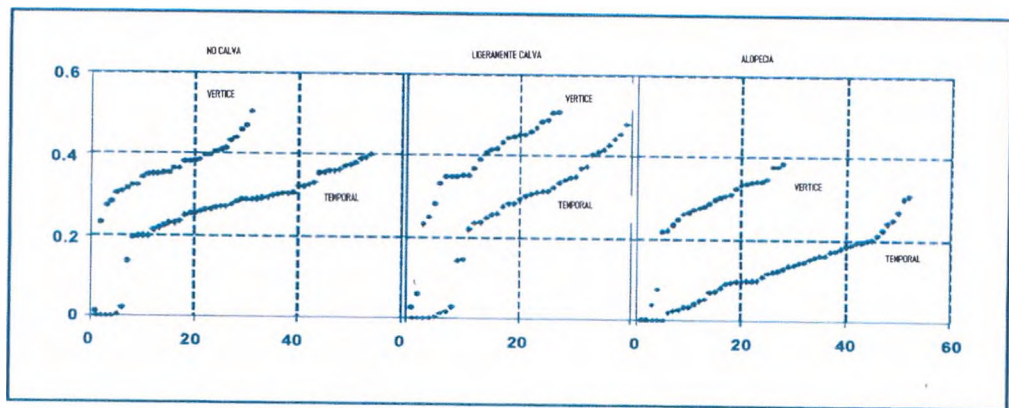
*Figura 10 - Ciclos de crecimiento del pelo, en el cuero cabelludo humano*

Por otra parte la duración de los estados mencionados depende del lugar anatómico, edad de la persona y genero, como consecuencia un mechón de cabello de un cuero cabelludo contiene entre 5 y 20% de cabello en el estado de telógeno el cual puede ser 6 meses mas de viejo que la mayoría del cabello anágeno como se muestra en la tabla siguiente muestras de cabellos del cuerpo, axilas, púbico contiene cerca de 50% de cabello telógeno el cual puede ser de 12 o 17 meses mas viejo que el cabello crecido (Fritz Pragst, 2005).

<i>Ubicación anatómica</i>	<i>Fase anágena</i>	<i>Fase catágena+telógena</i>	<i>% telógena</i>
cuero cabelludo	2 - 6 años	2 a 6 meses	5 - 20
vértice occipital (con alopecia)	-	-	53 - 84
Pelos de barba	14 - 22 meses	9 a 12 meses	35 - 40
Vello púbico y axilar	11 - 18 meses	12 - 17 meses	50
vellos del brazo	5 - 15 semanas	8 - 24 semanas	60

*Tabla N° 1 : Duración de las etapas de crecimiento y porcentaje de pelo telógena (Fritz Pragst, 2005)*

Por su parte, Hayashi et.al (1991) midieron la tasa de crecimiento de pelos del vértice occipital y de la región temporal, del cuero cabelludo, de tres personas: una no calva, otra ligeramente calva y una tercera con alopecia. Se observa que la tasa individual, varía más del 50%, según la zona del cuero cabelludo.(Fig. 4)



*Figura 11 – Relación de crecimiento del pelo de una persona no calva, otra ligeramente calva y una tercera con alopecia; comparando la zona del vértice occipital y la región temporal (Hayasi et.al., 1991)*

#### **4.5 - Velocidad de crecimiento del pelo**

En toxicología forense es interesante conocer la velocidad de crecimiento del pelo de un individuo, sobre todo si se ha de establecer la relación entre un determinado segmento de pelo y el periodo de tiempo de su formación en el folículo. Establecer la velocidad exacta del crecimiento del pelo es muy difícil debido a que este proceso es asincrónico en los seres humanos.

Estudios realizados por Hopps, (1977), Giovanoli, Jakubcza y col., (1974), Chatt y col., (1988), Pötsch (1995 a) que fueran revisados por Repetto (2005) llega a la conclusión que aunque la comunidad científica internacional admite que el cabello crece aproximadamente un centímetro cada mes, este dato sin ser incorrecto es una sobresimplificación ya que los datos proporcionados por los autores mencionados no son totalmente concordantes.

<b>Región anatómica</b>	<b>Relación de Crecimiento</b>	
	<b>mm/día</b>	<b>mm/mes</b>
Vértice occipital	0,28 - 0,47	0,8 - 1,4
Vello púbico	0,2 - 0,3	0,6 - 0,9
Vello de axila	0,29 - 0,33	0,87 - 1,0
Brazos	0,25 - 0,29	0,75 - 0,87
Cuerpo	0,22 - 0,32	0,66 - 0,96

*Tabla N 2 - Relación de crecimiento del pelo en diferentes lugares del cuerpo. (Fritz Pragst – 2005)*

#### **4.6 - Distintos tipos de pelo**

✓ **Pelo de barba** son pelos gruesos y de folículos muy grandes. Como se vio anteriormente las glándulas sebáceas no vierten sus secreciones en el canal folicular, de forma tal que la contaminación grasa en este tipo de pelo es mínima. También difieren de los otros pelos en el hecho que crecen mas lentamente.

✓ **Vello púbico y axilar** son pelos rizados que dificultan el análisis secuencial; están poco expuestos a contaminación externa como así también a los tratamientos cosméticos. En el caso del bello púbico la contaminación mas frecuente esta dada por la orina y en el axilar por la transpiración. El pelo púbico es el mas usado cuando no hay disponible cabellos.

✓ **Cabello** según su ubicación se distinguen cabellos de región: frontal, temporal, parietal, occipital, nuca. El vértice occipital es la zona de elección para obtener muestras analíticas, por ser la zona menos afectada por factores tales como la edad y el sexo donde el porcentaje de cabello en etapa anagena es el mas elevado que en otras regiones.

También Repetto (2005), en la revisión de trabajos realizados por (Kintz et al, (1993, 1995); Offidani y col., (1993), Cone (1993), llegan a la conclusión que en todos ellos se cuantifica la droga presente en el cabello y se compara con la existente en pelo recogido en otras zonas anatómicas, que varían de unos estudios a otros y que cuando se compara el bello púbico axilar y cabello las concentraciones son siempre mas alta en el bello púbico. Este hecho puede atribuirse a que la velocidad de crecimiento es mas lenta en el vello púbico por los que las drogas se quedan acumuladas en mayor concentración que en el cabello; por otra parte según las características higiénicas individuales no puede descartarse la contaminación del bello púbico por orina y el aporte de drogas por ella. (ver tabla N° 3)

A conclusiones semejantes llega Fritz Pragst (2005) analizando trabajos de Hayashi et al. (1991)

*En la página siguiente se observa la Tabla N° 3 - Revisión de los trabajos relacionados con la determinación de drogas de abuso en muestras de pelo recogidas de diferentes zonas anatómicas. ( Repetto et .al 2005)*

<i>Año</i>	<i>1<sup>er</sup> Autor</i>	<i>Drogas detectadas</i>	<i>Cabello</i>	<i>Otros</i>	<i>Nº de muestras</i>
1993	E. Cone	Cocaína	0'4 - 76'0 (20+)	brazo: 0 - 109'0 (17+)	20
		Benzoilecgonina	0 - 15'8 (14+)	brazo: 0 - 12'5 (12+)	20
		6 - MAM	0 - 0'8 (14+)	brazo: 0 - 3'1 (6+)	20
		Morfina	0'2 - 0'9 (5+)	brazo: N. D.	20
1993b	P. Kintz	Morfina	0'6 - 27'1 (20+)	axila: 0'4 - 24'2 (20+)	20
				pubis: 0'8 - 41'3 (20+)	20
		Codeína	0'15 - 1'9 (20+)	axila: 0'12 - 1'5 (20+)	20
				pubis: 0'2 - 2'3 (20+)	20
1993 <sup>a</sup>	C. Offidani	Morfina	0'2 - 5'3 (13+)	axila: 0'18 - 1'6 (14+)	14
				pubis: 0'18 - 31'7 (13+)	14
		Cocaína	1'7 - 70 (13+)	axila: 1'1 - 60 (13+)	14
				pubis: 1'1 - 166'7 (13+)	14
1995c	P. Kintz	Anfetamina	10'16 (1+)	axila: 2'65 (1+)	1
				pubis: 6'35 (1+)	1
				pierna: 15'6 (1+)	1
		MDA	7'96 (1+)	axila: 2'07 (1+)	1
				pubis: 4'19 (1+)	1
				pierna: 12'5 (1+)	1
		MDMA	53'38 (1+)	axila: 16'17 (1+)	1
				pubis: 35'37 (1+)	1
				pierna: 67'62 (1+)	1



## 5 - Incorporación y retención de las drogas al pelo

A pesar, del trabajo científico desarrollado para dilucidar el proceso de incorporación de las drogas al pelo, y de los lugares específicos donde las misma se fijan, aun no se conocen exactamente estos mecanismos. Lo que si ha propuesto la comunidad científica son dos tipos de modelos de ingreso de las drogas al pelo.

- Uno de ellos es el **monocompartimental** o **difusión pasiva** desde la sangre;
- El segundo se trata de un modelo **multicompartimental**.

### *Modelo monocompartimental o difusión pasiva desde la sangre*

Para entender el modelo *monocompartimental* debemos tener en cuenta que, en la base del bulbo piloso existe una red de capilares (ver fig.12) que tienen la misión de alimentar al bulbo a través de la papila y en este proceso las drogas difundirán de la sangre al bulbo y se unirán definitivamente a las macromoléculas que forman parte del pelo.

Este mecanismo, sugiere tener en cuenta diversos factores que condicionan la transferencia de la droga desde la sangre al pelo; entre otros se puede mencionar: la *liposolubilidad* de las mismas, los *procesos metabólicos* que sufren las drogas y su *concentración en sangre*. Sobre este modelo se apoya el análisis secuencial del pelo para obtener el perfil cronológico del consumo de drogas.

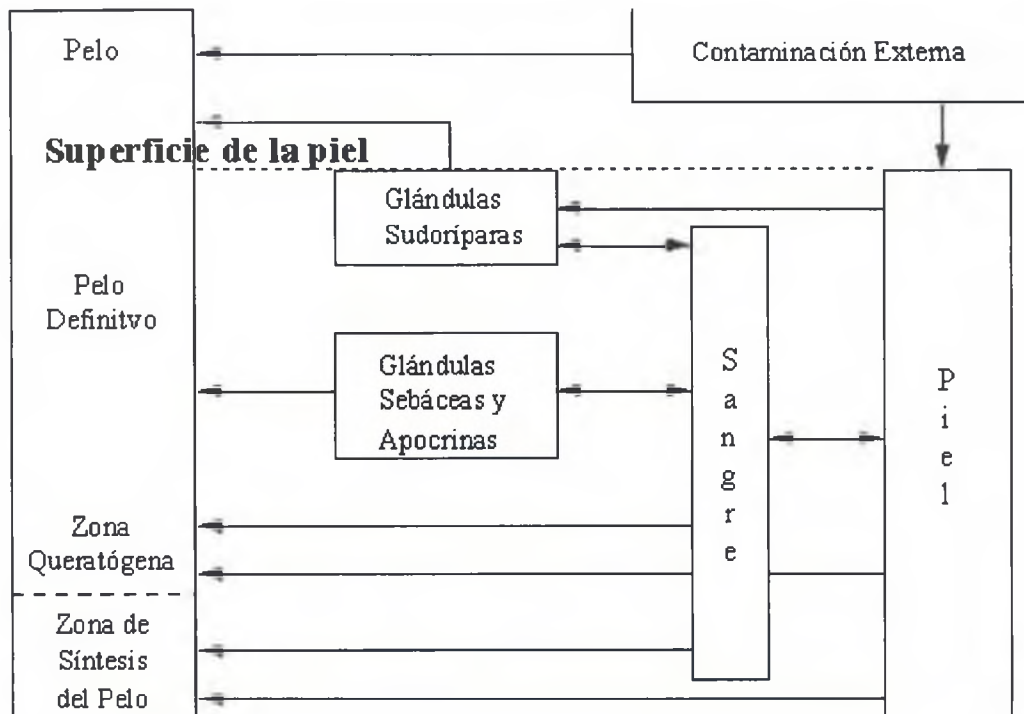
No es ilógico pensar que el folículo piloso se “embebe” de la droga por un simple mecanismo de biodisponibilidad, en una distribución uniforme de éstas hacia células metabólicamente activas.

Esta idea presenta varios datos que le quitan sustento: por un lado, estudios analíticos muestran que en pelo es mayor la concentración de droga íntegra más que sus metabolitos.

### *Modelo multicompartimental*

El modelo **multicompartimental** fue propuesto en 1993 por Henderson y si bien Wang y Cone en 1995, como así también Kidwell en el mismo año han propuesto otros esquemas, los tres consideran básicamente dos procesos: (Ver.

- ✓ por una lado la difusión pasiva desde la sangre al pelo.
- ✓ por otro que las mismas pueden llegar desde:
  - el sudor a través de las glándulas sudoríparas, lugar al que han llegado desde la sangre.
  - también desde el exterior llegarán por contaminación, por ejemplo cuando la droga se fuma o en el caso de pelos pubianos por contaminación de los mismos a partir de la orina
  - desde la piel se puede incorporar drogas muy liposolubles que serán transferidas a la sangre y de allí al pelo
  - desde las glándulas sebáceas y apócrinas, lugar al que también llegaron desde la sangre



*Figura 12 Esquema del modelo multicompartimental para la incorporación de las drogas al pelo. Henderson (1993)*

El hecho de poder determinar en el pelo durante largos periodos de tiempo sustancias de vida media muy cortas o sustancias muy lábiles, supone que las mismas quedan retenidas firmemente por medio de la formación de complejos estables y permanentes.

Hay tres compuestos encargados de retener y captar las drogas en el pelo:

- ✓ Las **proteínas** tienen grupos funcionales (aminos, carboxilos, oxhidrilos, sulfhídricos), que poseen capacidad para unirse a sustancias de distinta naturaleza química; los mecanismos y tipos de enlaces aun no están dilucidados

- ✓ Los **lípidos** del pelo como ya se menciona, están constituidos por ácidos grasos libres; mono, di y triglicéridos, sustancias estas que cuentan con

grupos funcionales polares en su estructura, como también insaturaciones, que junto a ésteres de cera y alcoholes son capaces de unir a ellas los compuestos que llegan al pelo

✓ La **melanina**, desde el punto de vista químico este compuesto es un polímero de unidades de indol 5, 6-quinona, *esta idea de relacionar la melanina con la fijación de las drogas al pelo fue uno de los primeros mecanismos propuestos W.H. Harrison, R.M Gray and L.M .Salomón-(1974)*

En base a esto se puede considerar que las sustancias se unirán a la melanina en función de su naturaleza química como así también van a estar condicionadas estas uniones por la cantidad de melanina existente en el pelo.

Hasta aquí se consideraron los *factores químicos* involucrados en los procesos de fijación de drogas al pelo pero también hay que tener en cuenta *factores que dependen de las características del pelo*, en este sentido:

✓ la **corteza** es la que mas influye, porque en esta zona se encuentra la mayor parte de la queratina y melanina que como se vio son fundamentales en la retención de las drogas al pelo.

✓ La **medula** por su parte es rica en proteínas lípidos que también son importantes en la fijación de sustancias al pelo.

✓ La **cutícula** ocasiona solo variaciones muy pequeñas en la concentración de drogas en pelo. También es importante considerar la integridad de la cutícula y el efecto que los tratamientos cosméticos pueden causar en ella

✓ **Color del pelo** factor importante a tener en cuenta el color viene dado por la concentración y distribución de los gránulos de melanina en el pelo, y la importancia que esta tiene en la fijación de las drogas.

Al respecto de todas estas consideraciones realizadas a cerca de las sustancias y características del pelo que de una manera u otra influye en los procesos de fijación. E. J. Cone (1993); R. W. Reid (1994); R. E. Joseph (1996), realizaron estudios en pelos de humanos; y en todos los casos observaron que la concentración de cocaína y de benzoilecgonina expresados en nanogramos/miligramos, fue mucho mayor en pelos pigmentados que en aquellos menos pigmentados Repetto, M – (2005), lo que asevera la influencia en la captación y fijación de droga por efecto de la melanina.

Por su parte estudios realizados por Nakahara y col (1995) estudiaron la capacidad incorporativa al pelo de distintas drogas observando que las drogas ensayadas presentaban marcadas diferencias de capacidad incorporativa, sugiriendo que esta diferencia se debía en un alto porcentaje a: estructura química de las moléculas, lipofilia, afinidad por la melanina y capacidad de atravesar las membranas

A pesar de que son numerosos los autores que han trabajado en este tema, cabe mencionar que la droga incorporada por diferentes tipos de cabellos es aun motivo de discusión. *(Ver en las páginas siguientes la tabla N° 4 y la figura N° 13)*

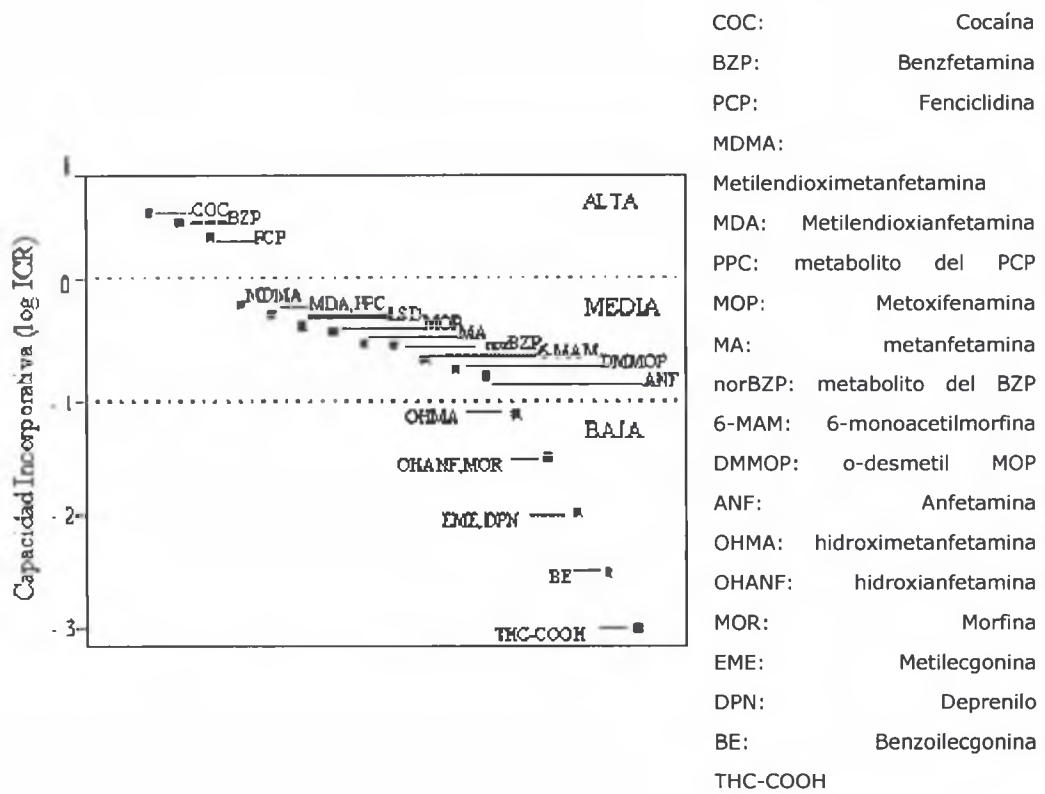


Figura 13 - Clasificación de las drogas según su capacidad incorporativa al pelo  
(Datos obtenidos de Nakahara y col., 1995b)

<b>Autor</b>	<b>Estudio (especie)</b>	<b>Drogas detectadas</b>	<b>Más pigmentado</b>	<b>Menos pigmentado</b>	<b>N° de muestras</b>
E. J. Cone 1993	in-vivo (humano)	Cocaína	23'55 ± 23'38	6'08 ± 6'00	20
		BE	2'77 ± 4'53	1'83 ± 2'84	20
		6-MAM	0'19 ± 0'26	0'12 ± 0'15	20
		Morfina	0'13 ± 0'31	0'03 ± 0'08	20
R. W. Reid 1994	in-vitro (humano)	BE	951'6 - 1938'7	298'9 - 319'9	9
D. L. Blank 1995	in-vitro (humano)	Cocaína	11'1	1'64	6
B. Gerstenburg 1995	in-vivo (rata)	Nicotina	relación 20/1		
		Cotinina	relación 10/1		
D. E. Rollins 1995	in-vivo (rata)	Codeína	111'9 ± 18	0'96 ± 0'10	24
		Morfina	14'46 ± 1'81	0'34 ± 0'04	24
		Fenobarbital	12'1 ± 0'5	12'0 ± 0'5	6
S. J. Green 1996	in-vivo (rata)	Metadona	31'3 ± 4'1	7'4 ± 1'2	36
R. E. Joseph 1996	in-vitro (humano)	Cocaína-d <sub>3</sub>	8678 ± 2333	887 ± 280	7
M. H. Slawson 1996	in-vivo (rata)	Fenciclidina	14'3 ± 1'43	0'5 ± 0'04	5
K. M. Höld 1996	in-vivo (rata)	Stanozolol	60 - 751'4	40'2 - 118'8	5

*Tabla 4.- Revisión de los trabajos relacionados con la influencia de la melanina en la concentración de los fármacos presentes en el pelo*

## 6 - Particularidades analíticas y de interpretación de los resultados del análisis de drogas en pelo

### 6.1 - Particularidades analíticas

El análisis de pelo, al igual que el de otras muestras biológicas, como sangre, orina o vísceras, contempla una serie de etapas, a saber:

1) *Recogida de la muestra.* Aunque se puede tomar de cualquier parte del cuerpo (pubis, axila, barba, brazos o piernas), a efectos comparativos, conviene recoger la muestra siempre del mismo lugar anatómico. La región idónea para el cabello es la occipital. Se debe cortar un mechón del grosor de un lápiz lo más cerca posible del cuero cabelludo y fijarlo a un papel blanco, diferenciando los extremos proximal y distal.

2) *Procesado de la muestra.* Es muy laborioso y consta de las siguientes fases:

- Medida de la longitud del mechón y troceado del mismo
- Lavado de la muestra, se recomienda efectuar, al menos, dos lavados con disolvente orgánico, agua o buffer.
- Pesado de la muestra.
- Extracción de las drogas de pelo, que se puede realizar bien extrayendo directamente con disolventes orgánicos o realizando una hidrólisis, que puede ser ácida, alcalina o enzimático.
- Purificación de los extractos obtenidos, mediante una extracción líquido/líquido o en fase sólida (SPE).

3) *Análisis instrumental,* para lo que se requiere instrumentación de gran sensibilidad, ya que las concentraciones, a determinar, están normalmente en el rango de ng/mg. Conviene comenzar la fase analítica con análisis de screening que son de gran utilidad en el sentido que diferencia entre las muestras negativas y positivas que se están analizando y cuyos



resultados dan mayor robustez al análisis posterior; entre los métodos de tamizaje, se pueden utilizar cromatografías en placa delgada o bien últimamente tienen mucho auge los análisis inmunológicos y en especial los radioinmunoanálisis por su sensibilidad y su capacidad de automatización. Luego de la etapa de screening siguen los análisis confirmatorios entre los que figuran las cromatografías gaseosas, líquidas, la electroforesis capilar; disponiendo en la actualidad una variedad de detectores que permiten aumentar la eficiencia, la exactitud, la sensibilidad y en general los requisitos de la química analítica moderna.

## 6.2 - Interpretación de los resultados cuantitativos.

Uno de los problemas más importantes, que se le plantea a cualquier toxicólogo, es la interpretación adecuada de los resultados cuantitativos que obtenga después del análisis de una muestra determinada. Este problema se agrava en los análisis de pelo, ya que al ser una matriz biológica más compleja y de empleo más reciente, al menos en toxicología, que la orina y la sangre, hay muchas cuestiones que no están totalmente dilucidadas, como son, entre otras:

Criterios para evitar falsos resultados positivos causados por la contaminación externa: entre otros se pueden considerar los siguientes:

- *Análisis de los lavados.* Es conveniente investigar en los líquidos de lavado la presencia del analito de forma tal de poder saber si existe contaminación externa o pérdida del analito contenido dentro de la matriz.
- *Aplicación de cocientes droga/metabolito.* Quizás el desafío más grande para el modelo de transferencia pasivo sea el hallazgo de altas relaciones droga / metabolitos. La cocaína fue identificada como analito primario en el cabello de todos los cocainómanos, encontrándose en concentraciones 6 veces mayores que su metabolito primario benzoilecgonina y aproximadamente 10 veces más que ecgonina metil éster.
- *Establecimiento de valores de corte adecuados.* A la hora de obtener resultados analíticos es importante tener en cuenta la posibilidad de detectar la droga madre y además productos de biotransformación. Para los que debe

emplearse valores de corte (cut-off) que aportan un sustento firme al resultado analítico obtenido.

Un gran número de expertos de reconocida trayectoria internacional, indican valores de corte promedios de 0,5 ng por mg de pelo, mientras otros grupos de investigadores en Francia informan valores de 1 ng por mg de pelo.

- *Relación entre dosis de droga consumida y concentración detectada en el pelo*, para así poder realizar una interpretación cuantitativa del consumo. El análisis del pelo puede, al menos, proporcionar información sobre la severidad del consumo y orientar sobre si se trata de un consumidor de cantidades altas, moderadas o bajas de droga. Baumgartner y colaboradores han reportado correlación positiva entre sujetos adictos y las concentraciones de heroína, cocaína y marihuana en su pelo. Nakahara encontró una buena correlación entre la dosis de metoxianfetamina y la concentración de droga en el pelo de 5 personas.
- *Tiempo de aparición y desaparición de las drogas en el pelo* después del consumo. Los distintos autores coinciden en que las drogas empiezan a detectarse en un periodo entre 1-3 días después de la absorción, y que, una vez finalizado el consumo, permanecen detectándose durante un periodo que depende de la cronicidad del consumo y del tipo de droga.
- *Dosis mínima de droga detectable en el pelo*. Es muy difícil, incluso a veces imposible de establecer.
- *Influencia de la raza y del color del pelo*. Está demostrado que cuanto más oscuro es el pelo, mayor es su contenido en melanina y también mayor la capacidad incorporativa de las distintas drogas.
- *Influencia del tratamiento cosmético*. Se produce una disminución en la concentración de las drogas presentes en las muestras tratadas cosméticamente respecto de las que permanecen sin tratar. Esta disminución es siempre más severa en el pelo decolorado que en el teñido.
- *Calidad del pelo analizado*. También influye la calidad del pelo, cuanto más deteriorado o dañado se encuentre el pelo, mayores son las pérdidas en concentración.

## 7 - El análisis Toxicológico

### 7.1 - Toma, conservación y reserva de muestras en el laboratorio de Toxicología.

En la actualidad, el laboratorio de toxicología se encuentra con un gran número de muestras biológicas conteniendo sustancias en concentraciones al nivel de trazas. La investigación para analitos desconocidos se lleva a cabo mediante la denominada marcha sistemática toxicológica. La adecuada elección, recolección y envío de las muestras es de fundamental importancia ya que la calidad de un resultado nunca puede ser mejor que el de la muestra.

Para la determinación de los diferentes tóxicos suelen emplearse con mayor frecuencia muestras biológicas como orina, sangre, contenido estomacal y vísceras en casos forenses. También el pelo, la saliva y las uñas están siendo hoy en día consideradas como matrices alternativas de gran importancia en el análisis toxicológico.

Para la *recolección de la muestra* se debe proporcionar instrucciones detalladas a las personas o entidades encargadas, las cuales deben incluir el tipo y la cantidad mínima requerida, tipo y cantidad de conservante que se debe añadir, la forma de etiquetado de los contenedores y las condiciones de empaquetado y transporte.

La óptima toma de muestra en un laboratorio de toxicología clínica es de vital importancia para lograr una adecuada identificación y cuantificación ulterior de un analito y/o su producto de biotransformación.

La adecuada selección, recolección, preservación y envío de especímenes biológicos y cualquier otra muestra con el propósito de una investigación toxicológica forense es sumamente importante. El éxito de un estudio analítico y su interpretación dependen en gran parte de esta etapa.

El tipo de muestra analizada debe ser identificada con el nombre completo del paciente, el día y hora de recolección así como la naturaleza de la muestra aunque sea evidente.

La elección de la muestra esta estrechamente vinculada con la toxicodinámica del analito buscado. Mediante el conocimiento de su distribución, metabolismo y eliminación se han diseñado técnicas analíticas orientadas a la búsqueda de la droga madre y/o sus metabolitos para su identificación y si fuera necesario, su cuantificación.

Por otra parte, la vinculación entre el caso clínico y el analista es de vital importancia para los resultados del análisis toxicológico. Idealmente esta relación debe comenzar antes que la muestra sea recolectada indicando algún requerimiento especial en algunos casos para la toma de muestra.

Las matrices alternativas como las *muestras de cabello* han adquirido importancia en los últimos años debido a las ventajas que presentan respecto de las muestras tradicionales de sangre y orina. Entre las ventajas se describe el hecho que las drogas o sus metabolitos permanecen en el pelo un considerable período de tiempo (semanas a meses) respecto de las matrices comunes. Por otra parte, las muestras de pelo son estables indefinidamente, presenta una forma simple de recolección y es un método no invasivo. El análisis en pelo ha sido aplicado con éxito al análisis de drogas antipsicóticas como haloperidol, en pacientes en hospitales psiquiátricos. No obstante su uso en clínica sigue siendo restringido hasta hoy, dado que pocos fármacos han sido suficientemente estudiados para establecer correlaciones entre concentración en pelo versus dosis administradas.

Una amplia variedad de drogas de abuso (cocaína, opiáceos, anfetaminas, cannabinoles y fenciclidina) han sido determinadas en pelo humano. Además el análisis en pelo permite diferenciar entre una exposición ambiental y el uso activo de las drogas mediante la cuantificación correspondiente y la relación entre productos de biotransformación. Asimismo, permite también conocer la cronología del consumo analizando diferentes segmentos a diferentes distancias del origen (fóliculo piloso).

*La cadena de custodia debe empezar en el momento de la toma de muestra. La cadena de custodia incluye a los procedimientos que deben quedar por escrito en la documentación referidos a cualquier manipulación o transporte de la muestra desde un individuo o lugar a otro, así como intentar minimizar en lo posible el número de personas que manipulen la muestra.*

## **7.2 - Análisis toxicológico forense -**

Para la recolección de las muestras pilosas las mismas deben cortarse en sector occipital, bien al ras del cuero cabelludo, en lo posible 1 ó 2 grs. (en la práctica un puñado o mechón es suficiente). Tomar el extremo cercano al cuero cabelludo y colocarlo sobre papel o cartón para luego abrochar con aplique de broches de tamaño apropiado y colocar otro papel o cartón encima del anterior, luego de pegar o atar según corresponda siendo aconsejable resguardarlo de la luz en papel de aluminio. El envoltorio debe permanecer firme y debe indicarse claramente la zona cercana al cuero cabelludo y la distal.

Para el caso de requerir determinación de drogas en vello pubiano y axilar, este debe ser cortado al ras de la piel y colocarlo en sobre de papel común. Si la muestra se toma de un individuo fallecido es aconsejable arrancar el pelo para obtener el bulbo piloso mejorando las posibilidades de detección retrospectiva de ingesta.

## **7.3 - Introducción al Análisis Toxicológico Instrumental**

El objetivo es separar el agente tóxico en cantidad y pureza suficientes para permitir su caracterización y cuantificación. A su vez el compuesto madre no siempre está presente en cantidades importantes como para ser separado y los metabolitos conocidos pueden dar información de la sustancia madre. Sólo recientemente han surgido métodos disponibles que permiten la medida directa de algunos analitos sin la separación previa de su matriz.

A lo largo del tiempo, el análisis toxicológico ha ido evolucionando desde las primitivas estrategias de identificación, orientadas por grupos de sustancias y valiéndose de metodologías sencillas, hasta las disponibles hoy por medio de instrumentales de alta complejidad.

Cada caso a estudiar debería cumplir con un alto criterio de calidad, considerando disponibilidad, confiabilidad, especificidad y sensibilidad del método elegido. La toma de muestra constituye el primer eslabón y el que condicionará al resto del proceso hasta llegar al resultado. Por tanto establecer pautas claras en esta etapa crítica no resulta ocioso. Nuestro país carece hoy de una norma al respecto y los laboratorios aplican protocolos de diversas procedencias o bien siguiendo un criterio personal con arreglo a los principios de la Química Analítica. No obstante, a comienzos de esta década, se ha elaborado una guía de toma de muestra, conservación y transporte para análisis toxicológico, inspirada en parte en el documento de la Comisión STA (Systematic Toxicological Analysis Committee) del TIAFT (The International Association of Forensic Toxicologist).

En esta breve consideración, se plantean distintos aspectos del análisis toxicológico, desde los estrictamente técnicos como criterios y protocolos sobre selección, preparación y conservación de las muestras, hasta los aspectos legales asociados a los análisis como cadena de custodia y confidencialidad de los resultados.

Tradicionalmente se han usado diferentes tipos de microensayos químicos que de forma presuntiva y rápida dan información cualitativa sobre la presencia de tóxicos individuales, o de grupos y familias de medicamentos y drogas. Los resultados de estos ensayos y procedimientos, conocidos usualmente como "métodos de screening", deben ser confirmados por otras técnicas o procedimientos de mayor capacidad identificativa y que posteriormente permitan la correspondiente cuantificación. La evolución de estas técnicas ha llegado al actual auge de los

inmunoensayos, que fundamentalmente están desarrollados para muestras líquidas con bajas interferencias de la matriz, tales como orina, aguas, sueros, etc.

Respecto a los procedimientos de separación y aislamiento de tóxicos de las diferentes matrices, también se producen avances importantes desde la primera sistemática propuesta por Stas y Otto en 1855. La introducción de modificaciones en ésta última, mejoran los rendimientos en la separación de los analitos en distintas muestras, por *extracciones líquido-líquido*, utilizando disoluciones acuosas a pH diferentes o distintos disolventes orgánicos, o de mezclas de estos, cuyas tensiones iónicas o polaridades favorecen la especificidad y eficacia del proceso extractivo.

El uso de las técnicas analíticas de cromatografía de gases y líquida de alta resolución permiten utilizar micrométodos de extracción directa de pequeños volúmenes de líquidos a pH tamponados, también con pequeñas cantidades del disolvente extractor en tubos de ensayo cerrados, evitando el uso de ampollas de decantación, minimizando el tiempo de análisis, disminuyendo notablemente la cantidad de disolventes orgánicos y evitando en muchas ocasiones la necesidad de eliminar por evaporación el disolvente. Todas estas circunstancias han conseguido mejorar los límites de detección de los analitos, incrementar la exactitud y disminuir relevantemente los límites de determinación gracias a que puede añadirse a la matriz, exiguas cantidades de patrones internos indirectos o directos deuterados. (análogos deuterados)

Una importante mejora en el análisis de compuestos orgánicos ha sido la utilización de métodos de *extracción en fase sólida (SPE)*, que usan pequeñas columnas rellenas de gránulos de fases sólidas apolares, polares o de resinas iónicas. Más recientemente se han implantado resinas mixtas, constituidas por fases sólidas apolares y/o polares funcionalizadas con grupos intercambiadores iónicos ácidos o básicos. Puede afirmarse que prácticamente en la actualidad estos métodos de extracción en fase sólida han desplazado a los métodos anteriores debido a su rapidez, obtención de extractos de alta pureza, costo (este es elevado en la etapa de

adquisición del sistema de cámara de vacío, pero es compensado en el tiempo con el ahorro de disolventes de pureza analítica; más aún si las muestras recibidas son cuantiosas ) y mejora en los límites de detección , así como los porcentajes de recuperación o extracción de los analitos. Las columnas de SPE (Fig. 14) permiten aislar compuestos de interés a partir de una matriz biológica compleja, o que contiene sustancias interferentes, en alto grado de pureza y con un alto porcentaje de recuperación. Sin embargo el principio de extracción es muy diferente al de las columnas con tierra de diatomeas. Las columnas de SPE contienen un empaquetamiento de sílica químicamente enlazada a distintos sustituyentes, de modo tal que se aprovechan las interacciones polares, no polares o basadas en intercambio iónico entre los componentes de la muestra, el adsorbente sólido, y el eluyente apropiado.

Las columnas se elaboran en polipropileno para asegurar su inercia química. En su parte inferior se coloca el relleno, comprimiendo suavemente entre dos filtros de micro-fibra de vidrio, químicamente inertes. En su parte inferior la columna se estrecha, ajustándose en el adaptador individual que forma parte de la tapa del sistema extractor.



*Foto 18 - Columnas SPE.*



Un sistema extractor clásico (Fig. 15) consta de una cámara de vidrio transparente de forma rectangular, con tapa que permite asegurar el vacío en el interior del sistema. En uno de los costados lleva un tubo de salida, una válvula de regulación de vacío y un manómetro.

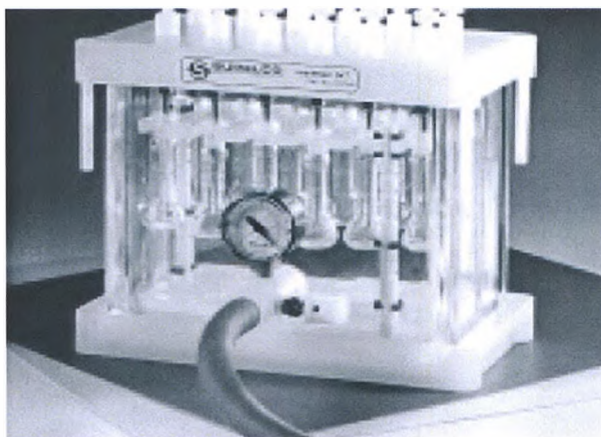


Foto 19 – Cámara de vacío para SPE

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

La extracción en fase sólida está cada vez más extendida, pues proporciona una extracción más rápida y selectiva y requiere menores volúmenes de disolvente orgánico. La utilización de sílice ligada para la extracción de muestras, parte de su empleo en HPLC.

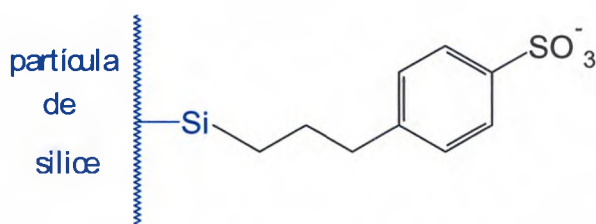
*La extracción en fase sólida* es una técnica cromatográfica que implica la partición de compuestos entre una fase sólida y una fase líquida, debiendo el compuesto a extraer tener mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra y al mismo tiempo ser fácilmente extraíble por un pequeño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

disolvente. Una típica secuencia de extracción incluye acondicionamiento, aplicación de la muestra, lavado y finalmente elusión del analito.

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

A finales de los 80 se desarrollaron las llamadas fases de función mixta, en las que parte de los grupos silanoles se han hecho reaccionar con cadenas alquílicas de longitud intermedia y otra parte con sustituyentes que permiten el intercambio catiónico, por lo que se pueden dar interacciones de tipo polar y apolar. Se usan solventes y reactivos de grado HPLC.

La SPE se realiza en columnas Clean Screen de un mililitro copolimérica (world wide monitoring o similares como de la firma Analytichem). Estas contienen partículas de sílica de 40µm enlazadas químicamente a grupos alquilo (C<sub>18</sub>,C<sub>8</sub>) y a grupos bencenpropilsulfónico (intercambio catiónico). Estos le dan la aptitud al relleno de participar en ambas interacciones no polares y de intercambio catiónico.



*Fig. 14 - Fracción copolimérica de intercambio catiónico*

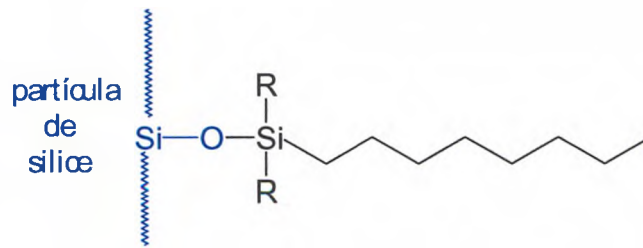


Fig. 15 - Fracción copolimérica no polar

Los factores críticos a tener en cuenta al afrontar una extracción en fase sólida una vez establecido el procedimiento son:

- el ajuste del pH .
- la velocidad de flujo en las distintas etapas.
- el control de los tiempos de secado.

También hay que tener en cuenta que pueden existir variaciones en la manufactura de las columnas de un mismo o diferente lote comercial, que puede ser la causa de variaciones en los rendimientos. De ahí la importancia del empleo de un estándar interno adecuado (Bogusz y col. 1996).

Aunque hoy en día su aplicación se limita a familias concretas de compuestos, se mencionará también la *extracción por inmunoadsorción*. Se basa en la interacción selectiva entre el anticuerpo y el analito por lo que permite una extracción altamente selectiva, aumentando la sensibilidad y la recuperación. No es necesario el pretratamiento de la muestra para la liberación de los conjugados y permite la inyección directa en HPLC

Los extractos obtenidos por cualquiera de los procedimientos antes descritos, deben ser reducidos a un volumen menor, para aumentar la concentración de los analitos presentes, e incluso llevados a sequedad para redisolvelos

posteriormente en un solvente más adecuado según la técnica de identificación que se seguirá. Esta operación requiere que los analitos sean estables térmicamente y que no se volatilicen junto con el solvente. El método usual consiste en colocar los viales en placas calefactoras (temperatura menor de 40 °C) y bajo corriente de nitrógeno. El método de elección es la utilización de la evaporación a presión reducida en rotavapor, lo que permite eliminar el solvente a bajas temperaturas (40 °C).

Hoy día la detección de xenobióticos en matrices biológicas es una tarea difícil, no solo por que se necesitan equipamientos que son relativamente costosos, si no también porque aparecen entidades químicas diferentes con transformación parcial o total de las mismas en el organismo, lo que conlleva una buena preparación por parte de los químicos, así como el desarrollo de técnicas de laboratorio lo suficientemente sensibles y específicas, además de contar con los patrones de referencia de las drogas y sus posibles metabolitos.

Debido a esta amplia variedad de sustancias que pueden estar presentes en un determinado fluido o matriz, hace casi imposible diseñar un esquema único para aislamiento y determinación de las mismas.

#### **7.4 – Metodologías de Screening**

Como hemos dicho precedentemente, el procedimiento analítico toxicológico incluye usualmente dos pasos.

- El primero consiste en realizar un análisis preliminar que permite identificar las muestras negativas, que no contienen el analito o alguno de sus metabolitos de las drogas u otros tóxicos que pudieran estar presentes en la muestra (*pruebas de screening o tamizado*).
- El segundo paso involucra la confirmación de la identidad de las sustancias presentes en las muestras positivas.

Las pruebas de screening proveen sólo resultados preliminares y no tienen poder de decisión. Indican claramente la ausencia de una droga, es decir, no informan falsos negativos. Sin embargo, un resultado positivo debe ser confirmado por otro método específico. Siempre debe realizarse al mismo tiempo que se analiza la muestra un control positivo y uno negativo. Un control negativo (blanco) ayuda a asegurar que falsos positivos (por ejemplo contaminación con reactivos o material de vidrio con el analito en cuestión o la presencia de componentes de la muestra) no sea obtenido. Igualmente, la inclusión de un falso positivo sirve para asegurar que los reactivos han sido preparados en forma correcta y han mantenido su estabilidad. Un resultado sospechoso falso positivo debe ser repetido usando material de vidrio correctamente lavado y enjuagado finalmente con agua bidestilada. En toda circunstancia los ensayos de comprobación deben realizarse sobre una nueva alícuota de la muestra, lo cual implica que en el momento de decidir que ensayos se van a realizar, se debe tener presente reservar un volumen adecuado para confirmar el resultado. En algunos casos, el resultado negativo a la presencia de determinados compuestos o familias de compuestos que normalmente no quedan incluidos en la sistemática analítica toxicológica por sus especiales características fisico-químicas, simplifica notablemente el tiempo total de análisis de esas muestras y por lo tanto el costo del mismo. Hay que resaltar que tanto las técnicas cromatográficas en capa fina y las técnicas inmunológicas, no requieren personal altamente especializado para llevarlas a cabo, lo que permite su uso en cualquier tipo de laboratorio. *A pesar de la necesidad de confirmación la información que aportan las técnicas de tamizaje es siempre de gran valor y contribuye a dar mayor solidez al resultado final del análisis.*

Previo al inicio de la sistemática mencionada, se somete a la muestra a un barrido aplicando fundamentalmente dos tipos de técnicas: los *inmunoensayos* y la *cromatografía en capa fina* que orientan los siguientes pasos del procedimiento analítico.

Se hará referencia a las metodologías inmunológicas, *y concretamente a los radioinmunoanálisis* ya que actualmente se puede considerar que los inmunoensayos

en general, están suplantando a las técnicas cromatográficas en placa delgada.(Repetto,2005), y que por otro lado es una de las metodologías usadas en el presente trabajo.

Las técnicas inmunológicas no precisan en la mayoría de los casos la extracción previa de las muestras, siendo requeridos volúmenes muy pequeños de las mismas. Además permiten un barrido más amplio, rápido, sensible y eficaz de un gran número de sustancias, en un elevado número de muestras, por ser fácilmente automatizables.

### **7.5 - Inmunoanálisis**

Los inmunoensayos ocupan un lugar importante dentro de los métodos de tamizaje aplicados rutinariamente para el análisis de drogas de abuso y medicamentos en fluidos biológicos y otras matrices. Todos los inmunoensayos se basan en la interacción de una molécula, antígeno, con su correspondiente anticuerpo. En el análisis toxicológico se utilizarán por tanto anticuerpos específicos para el tóxico en estudio o para un grupo de tóxicos estructuralmente relacionados, y la forma marcada bien del tóxico o del anticuerpo para generar una señal medible.

El mecanismo del inmunoensayo implica una reacción competitiva entre el antígeno (tóxico) presente en la muestra y el antígeno añadido en cantidad conocida, como parte del sistema de ensayo, para establecer la unión con el anticuerpo. El antígeno añadido o el anticuerpo han de estar marcados de tal forma que su detección sea posible en el sistema de análisis elegido. Los resultados se puedan interpretar empleando una curva de calibración realizada con una serie de patrones de concentración conocida del tóxico objeto del análisis. En otras ocasiones los resultados se compararán con una única concentración de patrón, que marcará el nivel mínimo a partir del cual una muestra se considerará positiva a la presencia de esa sustancia (cut-off). Las técnicas de inmunoensayo son capaces de alcanzar una alta sensibilidad, llegando hasta concentraciones del orden de  $\mu\text{g/ml}$  incluso picog/ml.

Los inmunoensayos se dividen en dos tipos dependiendo de que una vez que haya tenido lugar la reacción de unión del tóxico presente en la muestra con el anticuerpo, sea necesario o no separar la fracción del tóxico marcado desplazado de la fracción que permanece enlazada, antes de efectuar la medida. Según este criterio, podemos distinguir:

- inmunoensayos homogéneos, en los que no es necesaria la separación
- inmunoensayos heterogéneos, en los que sí lo es.

Un ejemplo de inmunoensayo heterogéneo son los radioinmunoensayos (RIA), ya que no es posible diferenciar la señal producida por la droga marcada en forma libre (A), de la droga marcada en forma enlazada (B).

Tóxico + Tóxico\* + anticuerpo → Tóxico---anticuerpo + Tóxico\* (A) + Tóxico\*---anticuerpo (B)

En los ensayos homogéneos la unión del tóxico al anticuerpo da lugar a la aparición, modificación o desaparición de una señal, que es monitorizada durante el ensayo. En los casos en los que se emplea como marcador del tóxico una enzima o un compuesto fluorescente, el sistema de detección responderá a los cambios espectrofotométricos, como diferencias en la absorbancia de UV, de emisión de fluorescencia o de luminiscencia, que no precisan la separación previa de la fracción libre y la enlazada.

Los dos tipos de ensayos tienen una amplia aplicación en toxicología, presentando ambos ventajas e inconvenientes.

La capacidad de los inmunoensayos de hacer un barrido de las principales familias de compuestos de interés toxicológico, en un elevado número de muestras y en un tiempo relativamente reducido, ha estimulado al diseño de sistemas instrumentales automatizados, evolucionando desde equipos que proporcionaban una

automatización parcial, bien de los primeros o de los últimos pasos del ensayo, hasta la automatización total.

Entre los distintos marcadores empleados en los inmunoensayos se puede mencionar a: los radioisótopos, las enzimas las partículas de látex u oro coloidal, las moléculas quimiluminiscentes y fluorescentes.

### 7.5.1 - Los anticuerpos

El componente esencial de todos los inmunoensayos es el anticuerpo. Tanto él como la forma en la que se sintetice, será la clave de la eficacia del ensayo. Los anticuerpos son proteínas (inmunoglobulinas, Ig) producidas por los linfocitos en respuesta a un antígeno. Hay muchos tipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgE e IgD) aunque el tipo más utilizado en el diseño de los inmunoensayos es la IgG. La molécula de IgG se puede representar de una forma simplificada por la letra “Y”, con dos fragmentos que pueden unirse al antígeno, “Fab” en la parte superior y “Fc” en la base.

La mayoría de los tóxicos habituales pueden considerarse *haptenos*, no tienen un tamaño de molécula suficiente para poder provocar por sí mismos una respuesta inmune, por lo que las sustancias inmunogénicas se generan por conjugación previa del tóxico (hapteno) o sus derivados a una proteína transportadora de mayor tamaño. Las *proteínas transportadoras* adecuadas para este proceso son la albúmina sérica bovina y las inmunoglobulinas, entre otras. La conjugación tiene lugar a través de los grupos carboxilo (-COOH) y amino (-NH<sub>2</sub>) presentes en el tóxico, o en los derivados formados a tal efecto. La posición de la molécula en la que se produzca la unión con la proteína determinará la especificidad del anticuerpo resultante. Estas posiciones enlazadas quedan ocultas para posteriores reacciones.

En la síntesis de los anticuerpos es importante conocer el metabolismo del tóxico, así como la estructura y el metabolismo de otros compuestos estructuralmente relacionados con él. En algunos casos puede perseguirse la producción de un



anticuerpo con baja especificidad, para que sea capaz de reaccionar con toda una familia de compuestos.

En la síntesis de los anticuerpos también se pueden emplear las “moléculas puentes”. Se utilizan como espaciador químico entre el hapteno y la proteína transportadora, para permitir un mejor acceso del tóxico a los anticuerpos. Estas moléculas puente pueden dar lugar a interferencias ya que el animal de experimentación producirá anticuerpos frente al inmunógeno conjugado en su conjunto, no sólo a la molécula del tóxico.

La medida de la fuerza de unión entre el antígeno y el anticuerpo se evalúa a través de la *constante de afinidad*. La unión antígeno-anticuerpo no es de tipo covalente, es una unión reversible donde entran en juego diversas interacciones hasta alcanzar el equilibrio. Estas interacciones son más débiles, principalmente de formación de puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Las reacciones antígeno-anticuerpo se basan en que exista un acoplamiento espacial entre las dos entidades macromoleculares, el antígeno y el anticuerpo (Selby, 1999). A mayor afinidad, más rápida será la unión y los métodos inmunoquímicos serán más efectivos.

#### **7.5.1.2 - Anticuerpos policlonales**

Los anticuerpos policlonales contienen una mezcla compleja de anticuerpos resultantes de someter a un animal al proceso de inmunización. Los animales más empleados con este fin son conejos, ovejas y cabras. El procedimiento de inmunización consiste en la inyección del antígeno conjugado con la proteína acompañado de una serie de coadyuvantes que estimulan al sistema inmune. Se suceden varias inyecciones de la misma dosis o dosis más bajas, en intervalos regulares de tiempo, 3-20 semanas. Se van tomando muestras tras 10-14 días de la inyección para comprobar el estado de la respuesta inmunológica hasta que se alcanza el nivel máximo de producción de anticuerpos. Pueden existir variaciones según cuál sea el animal empleado y también entre distintas extracciones del

antisuero al mismo animal. Los antisueros policlonales son en muchos casos sometidos a procesos de purificación antes de su empleo. La principal ventaja que presentan estos anticuerpos es su mayor afinidad frente a los anticuerpos monoclonales.

### **7.5.1.3 - Anticuerpos monoclonales**

Los anticuerpos monoclonales son una única entidad que resulta del aislamiento de una célula productora de anticuerpos. Ofrecen la ventaja de ser una fuente continua de anticuerpos con las mismas características, de manera que si se ha conseguido un buen anticuerpo podrá ser producido indefinidamente. En primer lugar se procede a la inmunización del animal y a comprobar que se ha alcanzado el momento óptimo de la producción de anticuerpos. A continuación se aíslan las células productoras de anticuerpos, los linfocitos del bazo (normalmente de ratón), y se hibridan con células cancerígenas, originando hibridomas. Estos hibridomas se separan tras múltiples diluciones hasta conseguir una única célula capaz de segregar un único tipo de anticuerpos monoclonales (Kohler y col, 1975).

Normalmente los anticuerpos monoclonales tienen menor afinidad que los sueros policlonales equivalentes, lo que puede dar lugar a ensayos menos sensibles. Los anticuerpos monoclonales no son más específicos que los policlonales, pero una vez que se ha conseguido un anticuerpo específico, la línea celular puede ser almacenada y el anticuerpo ser producido indefinidamente. Hay que tener presente que en el análisis toxicológico la especificidad no es siempre el principal objetivo a alcanzar en los ensayos inmunológicos, a veces se prefiere abarcar a una familia de sustancias o que queden incluidos los metabolitos.

Los anticuerpos monoclonales presentan la ventaja de la pureza y la homogeneidad, fundamentales en el caso del enzimo-inmunoensayo.

Actualmente los avances en genética molecular han abierto un nuevo campo de grandes expectativas para la producción de anticuerpos monoclonales con aplicación en inmunoensayos (Chiswell y col, 1992).

#### 7.5.1.4 - Valoración de los anticuerpos

Una vez que se ha llevado a cabo la inmunización, la calidad del antisuero se establece mediante las *curvas de dilución de anticuerpos*. Esto va a demostrar la capacidad de unión del anticuerpo ante el tóxico problema, indicador de la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Se trata en primer lugar de escoger la dilución adecuada de antisuero, que vendrá determinada por el intervalo de concentraciones en el que se encuentre previsiblemente el tóxico a determinar y por la exigencia que tengamos en cuanto a la sensibilidad y exactitud del ensayo. La forma de determinar la dilución óptima es normalmente preparar distintas diluciones del antisuero y someterlas a la reacción inmunológica con distintas diluciones del antígeno marcado. Hay que tener en cuenta que una alta concentración de antisuero puede dificultar la reacción antígeno-anticuerpo por impedimento estérico. Una vez escogida la dilución del antisuero que produce la respuesta deseada, hay que comprobar que el anticuerpo también responderá al tóxico presente en las muestras, es decir deberemos comprobar que este último es capaz de desplazar al tóxico marcado de su unión con el anticuerpo. Es deseable que la *capacidad de enlace* del anticuerpo por el tóxico sea al menos del 50%. Si no se alcanza este requerimiento mínimo será necesario repetir el proceso de inmunización o recurrir a otros animales o a diferentes antígenos.

La *especificidad analítica o reactividad cruzada* de un inmunoensayo es un indicador de cómo va a responder el ensayo a otros tóxicos respecto al tóxico que se ha empleado como calibrador o estándar. Para calcular la reactividad cruzada de un compuesto se suele añadir una concentración conocida del mismo, se determina la respuesta obtenida y el porcentaje de reactividad cruzada se calcula como:

$$\text{Reactividad cruzada (\%)} = \frac{\text{Conc. aparente del tóxico ensayado} \times 100}{\text{Conc. del tóxico añadido}}$$

La reactividad cruzada puede calcularse con una sola concentración del tóxico o con varias, ya que la reactividad cruzada puede variar con la concentración, así mismo también puede ser recomendable preparar los patrones en la misma matriz de la muestra a analizar. Dependiendo de la muestra que vayamos a analizar nos interesará una determinada reactividad cruzada. Por ejemplo, al analizar compuestos cocaínicos en orinas perseguiremos una alta reactividad cruzada para la benzoilecgonina, si la muestra problema es saliva, nos interesará que la reactividad cruzada sea alta para la cocaína. Ni los compuestos pertenecientes a un mismo grupo, ni los tóxicos incambiados y sus metabolitos, así como compuestos isómeros tienen por qué presentar una reactividad cruzada paralela. Es importante conocer el fundamento teórico y por tanto la especificidad del inmunoensayo empleado para continuar correctamente con la siguiente etapa de confirmación por distintas técnicas instrumentales en la sistemática analítica toxicológica.

#### **7.6 - Inmunoanálisis heterogéneos**

Los inmunoensayos heterogéneos, como se mencionó, requieren la separación del antígeno libre del enlazado antes de realizar la medida. Esto se debe a que no existe diferencia entre la señal generada por el tóxico marcado unido al anticuerpo y el tóxico marcado libre. El paso de separación imprescindible en este tipo de ensayos aporta ventajas sobre los ensayos homogéneos. Se eliminan las posibles interferencias endógenas de las muestras antes de la detección, lo que permite alcanzar menores límites de detección. Estas ventajas hacen posible que se puedan analizar directamente muestras de sangre, mientras que en los ensayos homogéneos se requiere un paso previo de extracción. También es posible analizar muestras como pelo o saliva en las que los tóxicos se encuentran en concentraciones significativamente más bajas que en orina.

Se pueden emplear distintos métodos para separar el tóxico libre del enlazado (Craine, 1990; Selby, 1999), que pueden clasificarse en tres grupos:

- Adsorción del tóxico libre: empleando carbón activo o lechos porosos. El carbón activo presenta la desventaja de tener una alta capacidad de adsorción no siendo selectivo, por lo que parte de la fracción enlazada puede ser también adsorbida.
- Precipitación del complejo tóxico-anticuerpo: Se emplean sulfato amónico y disolventes orgánicos, como metanol, o la técnica del doble anticuerpo. Aunque el complejo tóxico-anticuerpo tenga un gran tamaño sigue siendo soluble, se pueden insolubilizar por adición de un segundo anticuerpo elaborado frente a las globulinas del animal empleado para la producción del primer anticuerpo. Así se consigue la precipitación de la fracción enlazada y se separa la fracción libre por decantación.
- Inmovilización del anticuerpo: El anticuerpo puede enlazarse covalentemente a las paredes de la celda de reacción o a una superficie que la recubre. Después de la incubación los complejos tóxico-anticuerpo permanecerán enlazados al soporte, mientras que el tóxico libre se elimina de la celda por simple lavado. También pueden recurrirse a la unión del anticuerpo a partículas magnéticas, que tras aplicación de un campo magnético al final de la reacción, quedarán depositadas en el fondo de la celda.

#### **7.6.1 - Radioinmunoanálisis**

Es el primer inmunoensayo que se desarrolló y sigue siendo el de elección en algunos casos por aportar una mayor especificidad. No obstante los radioinmunoensayos tienen algunos inconvenientes, en lo que se refiere a las exigencias de su manipulación, las que son controladas en nuestro País por la Autoridad Regulatoria Nuclear.

efectuar la medida se construyen curvas de dilución isotópica por adición de cantidades cada vez mayores del tóxico sin marcar, manteniendo constante la concentración del compuesto marcado.

Los radioisótopos más utilizados en RIA son el Iodo-125 ( $^{125}\text{I}$ ), el tritio ( $^3\text{H}$ ) y el carbono-14 ( $^{14}\text{C}$ ). El empleo de tritio o carbono-14 no provoca cambios en la estructura molecular del tóxico y no afectará a su unión con el anticuerpo, pero tiene la desventaja de que ambos son emisores de radiación  $\beta$  peligrosas por su alta energía, que precisa contadores de centelleo más sofisticados. La sustitución con  $^{14}\text{C}$  es la menos utilizada debido a que es un núcleo con una vida media muy larga, lo que resta sensibilidad a la determinación. Sin embargo el marcado del tóxico con  $^{125}\text{I}$  puede provocar cambios estructurales debidos a su gran tamaño, pero las emisiones que se producen son del tipo  $\gamma$ , menos energéticas y por tanto menos perjudiciales, además se caracterizan por su aparición en un corto espacio de tiempo y por tener una detección más sencilla y eficiente (Stewart, 1986). En el caso del empleo de trazadores iodados, se han desarrollado anticuerpos inmovilizados en las paredes de microtubos, lo que facilita la etapa de separación de las fracciones enlazadas al anticuerpo de la fracción libre, reduciéndola a una simple decantación. En otros casos se recurre a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente. Según la determinación de la radiactividad se realice sobre la fracción del antígeno enlazado o el libre, la medida será respectivamente inversamente o directamente proporcional a la concentración del tóxico presente en la muestra (Hand y col, 2004).

#### **7.6.1.1 - Aplicaciones del Radioinmunoanálisis**

La amplia expansión del consumo de drogas de abuso ha creado la alerta en el campo de la toxicología, preocupando no sólo el riesgo que implica para la salud el consumo de estas sustancias, sino también como pueden afectar a distintos aspectos del comportamiento humano, como la capacidad de desarrollar un trabajo, la capacidad de conducir o de practicar un deporte. Esto va unido a las consecuencias legales del consumo de estas sustancias y ha impulsado el desarrollo de distintas técnicas de tamizaje para su detección, existiendo una gran diversidad de ensayos

### 7.7.1 - Elección del método analítico

*La elección de un método analítico* se realiza en función del menor número de errores aleatorios o sistemáticos que pueda generar y debe ser vigilado por el programa de Garantía de Calidad. Previamente debe realizarse una revisión bibliográfica y se deben considerar los instrumentos disponibles y la duración de los análisis. Posteriormente hay que comprobar parámetros tales como:

- **Linealidad:** consiste en verificar que, en el patrón de calibración utilizado, la relación entre la respuesta, definida por el área o altura de los picos cromatográficos y la concentración, es lineal en el intervalo de concentraciones presentes en las muestras analizadas.
- **Sensibilidad:** un método es sensible cuando cambios pequeños de concentraciones originan cambios significativos en la respuesta analítica. El límite de detección y el de cuantificación son dos parámetros muy importantes.
- **Recuperación:** Se determina en una muestra a la que se le agrega patrones de concentración conocida del analito en cuestión y procesada con igual método analítico que el empleado en las muestras de concentración desconocida
- **Precisión:** es una medida del error variable. Aquí se define la idea de reproducibilidad.
- **Seguridad o exactitud:** es la medida del error sistemático.
- La **validación** es un proceso por el cual se evalúan las características de un método y se comprueba que las mismas cumplen una serie de requisitos preestablecidos. Es una parte muy importante del programa de garantía de calidad y permite asegurar que los resultados analíticos tienen la exactitud adecuada para su aplicación.

Los avances en la instrumentación analítica permiten aumentar la sensibilidad en las determinaciones de las sustancias que se desean investigar, lográndose

móvil debe ser de calidad cromatográfica, es decir, libre de sustancias orgánicas y de partículas mayores de 0,5  $\mu\text{m}$ .

2)- **Tuberías:** la fase móvil empleada en HPLC debe circular por tuberías que conectan los componentes del equipo. Obviamente estas tuberías deben ser inertes, empleándose tubos de acero inoxidable para conectar los componentes sometidos a alta presión (entre bomba-inyector, inyector-columna, columna-detector y detectores entre sí).

3)- **Bomba:** impulsa la fase móvil desde el reservorio de solvente al inyector y de allí a la columna. Las más usadas son las bombas de pistón.

Para cubrir el amplio rango de compuestos a separar se han propuesto eluciones en gradiente, es decir, se varía la composición de la fase móvil (porcentajes de los solventes) comenzando la elución con un solvente débil y aumentando progresivamente la proporción del solvente "fuerte". Para formar estos gradientes se emplea generalmente una bomba y válvulas solenoides que entregan cada solvente en una cámara de mezclado de pequeño volumen; la fase móvil formada en cada instante es entregada a la bomba.

4) **Inyector:** es una válvula que permite la introducción de la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema. Las proteínas presentes en las matrices biológicas deben eliminarse antes de inyectar la muestra para evitar que precipiten dentro del equipo. Además las muestras y estándares a inyectar deben estar totalmente libres de partículas en suspensión, ya que pueden rayar los sellos del inyector o bloquear tuberías. Para ello se utilizan filtros desmontables o fijos de 0,45 o 0,22  $\mu\text{m}$ .

5) **Columna Cromatográfica:** en general es de acero inoxidable, de 25 a 30 cm de longitud y 2 - 4 mm de diámetro interno, aunque en la actualidad existe variedad en el tamaño y material (columnas de acero recubierto con vidrio, plásticas, etc.).

Las fases estacionarias utilizadas en HPLC tienen un tamaño de partículas muy pequeño (5- 10  $\mu\text{m}$ ) para favorecer la interacción entre las moléculas de muestra y la fase móvil y aumentar de este modo la eficiencia en la separación de los



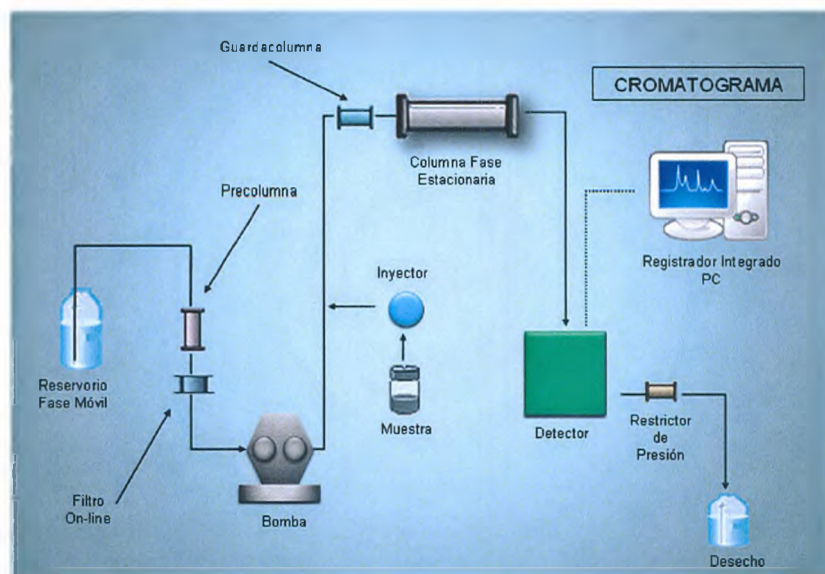
componentes. Además la cantidad de fase estacionarias es baja, lo que disminuye el tamaño de las columnas y los tiempos de corrida.

El mecanismo más común, es la cromatografía en fase ligada. Las fases estacionarias involucradas se denominan fases químicamente unidas (BPC), tienen sílica como soporte, y diferentes grupos químicos unidos a sus grupos silanoles. Son muy variables en cuanto a polaridad y selectividad de acuerdo al “líquido” unido a la sílica: C<sub>18</sub> (octadecilsilano), C<sub>8</sub> (octilsilano), C<sub>2</sub> (dimetilsilano), CN (nitrilo), NH<sub>2</sub> (aminopropil), diol.

Las más usadas en Toxicología son las de C<sub>18</sub> y C<sub>8</sub>, de baja polaridad que utilizan como fase móvil mezclas de agua (o soluciones salinas, buffers) con solventes orgánicos polares (por ejemplo, acetonitrilo, metanol).

6) **Detectores:** los *detectores generales* miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene al analito en comparación con la fase móvil pura, por ejemplo, el detector de índice de refracción. Los *detectores selectivos* son aquellos sensibles a alguna propiedad del soluto, por ejemplo, el detector UV que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una dada longitud de onda.

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



A continuación se muestra un cuadro comparativo entre GC y HPLC.

	CG	HPLC
Compuestos a analizar	Gases, líquidos o sólidos volátiles o capaces de ser volatilizados, de bajo peso molecular.	Líquidos o sólidos no volátiles Compuestos termolábiles, o de alto peso molecular.
Influencia de la fase móvil	La FM es un simple carrier del soluto y prácticamente no influye en la separación. El gas a usar depende del detector.	La FM es el parámetro fundamental que gobierna la separación. La FM no es inerte.
Columnas	Se requieren muchos tipos de columnas para abarcar todas las separaciones posibles	Una sola columna es capaz de separar sustancias polares, iónicas, no polares simplemente modificando la FM
Detectores	Diferencian fácilmente el soluto de la FM (gas inerte). Por ejemplo: captura electrónica, ionización en llama, etc.	Deben diferenciar el soluto en solución, de la fase móvil (líquida en alta proporción). Por ejemplo: fluorescencia UV, electroquímico, etc.

#### 7.7.4 - UPLC (Ultraperformance liquid chromatography).

Es un sistema de cromatografía líquida moderno caracterizado por columnas pequeñas de partículas cercanas al micrón, que ofrecen la ventaja de una mayor resolución y acortamiento de los tiempos resolutivos respecto de las técnicas de

cromatografía HPLC. Aparecen en el mercado hacia inicios del Siglo XXI y comienzan a aplicarse a mayor escala a partir del año 2004 o 2005. *Se cree que será la tecnología que se aplicará con desarrollo más avanzado en los próximos dos lustros y es la metodología que se aplicará en el presente trabajo de tesis*

#### **7.8 - Garantía de calidad.**

Las mediciones analíticas deben realizarse de forma tal que satisfagan un requerimiento acordado, como ser un sistema de calidad que produzca resultados de alta calidad. También es necesario contar con un control de calidad que diseñe las actividades para proporcionar dichos resultados y por último una garantía de calidad que asegure que las actuaciones del control de calidad se ejecuten correctamente

La garantía de calidad ha sido definida como "el conjunto de acciones realizadas para asegurar la fiabilidad de los resultados",

El Control de Calidad provee un medio para detectar errores inaceptables en el caso que surjan evitando la entrega de resultados inexactos. El control de calidad incluye controles de calidad internos y la participación en controles de calidad externos para comprobar la efectividad de la garantía de calidad.

El control de calidad interno en laboratorios analíticos es la verificación final de la correcta ejecución de todos los procedimientos (incluyendo la calibración) que están descriptos en el protocolo analítico y de todas las medidas a tomar para asegurar las buenas prácticas de laboratorio. Se lleva a cabo incluyendo materiales de referencia especiales, llamados "materiales de control" en la secuencia analítica. Los materiales de control deben ser en lo posible representativos de los materiales que se están ensayando en lo respecta en la composición de la matriz, el estado físico de preparación y del intervalo de concentración del analito. Tanto los materiales de control como aquellos usados para las calibraciones deberán ser trazables a

materiales de referencia certificados o por lo menos a un método de referencia reconocido.

La importancia y trascendencia de los análisis toxicológicos ha motivado que algunos organismos internacionales establezcan normativas para garantizar la calidad y fiabilidad de los resultados. Entre ellos se encuentran la International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT, 1994) y la Society of Hair Testing (SHT, 1997).

Las instalaciones del laboratorio deben ser tales que permitan la producción de datos analíticos de alta calidad y han de estar dirigido por una persona adecuadamente calificada, que organice la parte científica y al mismo tiempo sea capaz de aplicar técnicas de administración de personal y, finalmente, el equipo técnico integrante debe poseer adecuada educación profesional y entrenamiento y entender la importancia del programa de calidad y el papel que cada empleado desempeñe en él. En este sentido, laboratorios forenses de diversos países sudamericanos han iniciado el proceso de acreditación según normas ISO 17025, discutidas en el seno del Second TIAFT Regional Meeting en Santiago de Chile en Octubre de 2006.

Actualmente existen programas de control de calidad externo abiertos como lo es el de España por el Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM) y el Instituto Nacional de Toxicología de España; también se debe mencionar al Centre of Behavioural and Forensic Toxicology (CBFT), etc.

Antes de emitir el informe, todos los datos analíticos deben ser revisados por una persona con capacidad científica y con experiencia en los métodos analíticos empleados. La revisión debe incluir, al menos, documentación sobre la cadena de custodia, validez de los datos analíticos cualitativos y cuantitativos (cromatogramas de la muestra, de patrones y de un blanco) y datos del control de calidad. Por último se emitirá un informe escrito que presente los resultados del análisis y toda la información relevante de forma clara, exacta y sin ambigüedades (International Standards Organization, 1982).

Además es necesario disponer de un archivo de registros, que documente las actividades y operaciones llevadas a cabo y que incluya una copia del informe, datos de la cadena de custodia, hojas de trabajo, datos de laboratorio y registros de los análisis de garantía de calidad y de los controles de calidad. Todo esto debe ser lo más claro posible de manera que nos permita seguir todos los pasos del análisis y sacar conclusiones en caso de desviaciones. Se deben guardar durante un tiempo, que depende de las normativas gubernamentales, pero que, en general, es como mínimo de cinco años y tienen, por tanto, un valor potencial a largo plazo, sobre todo en los análisis toxicológicos que puedan estar envueltos en litigios, especialmente cuando los juicios se celebran años después de haber emitido el informe.

Los laboratorios que realicen análisis toxicológicos deberían estar acreditados, como ya se exige a los centros de control antidoping o a los que hacen análisis de drogas en el ambiente laboral en algunos países. Esta acreditación permitiría la autoregulación para asegurar la fiabilidad de los resultados, reduciría el potencial para trabajos incompletos o imperfectos y ayudaría a establecer argumentos razonables cuando el trabajo pudiera ser juzgado.

### ***7.9 - Interpretación de resultados.***

Para que una evidencia científica adquiera validez se deben definir los analitos a monitorear, relación droga madre/metabolitos, niveles mínimos detectables, tiempo transcurrido hasta la aparición de la droga en pelo, relación de la dosis respuesta, estabilidad de la droga en pelo, valores de corte (Cut-Off), efectos de tratamientos capilares, entre otras.

Así, debe establecerse que metabolito debe monitorearse junto a la droga madre, que se hallará ésta en mayor proporción. En el caso de cocaína se utiliza Benzoilecgonina, que se halla siempre en una concentración menor que la droga madre.

El área de mayor desacuerdo para la aceptabilidad del estudio analítico son los potenciales resultados falsos positivos, debido a contaminación externa de la matriz y a la diferencia en la proporción de droga incorporada según las características raciales. Recordemos que la melanina juega un importante rol en la incorporación de drogas en la matriz pilosa. En caso que un líquido de lavado arroje resultados positivos, deberíamos presumir una contaminación externa, inclusive pasiva. Es decir, personas que estuvieron expuestas en un ambiente donde se consumía drogas de abuso. No obstante, la unión de drogas a proteínas externas del pelo es débil.

Por ejemplo en el caso de analizar cocaína para interpretar los resultados, se debería tener en cuenta los distintos productos de biotransformación y otros productos de transformación química. Hay tres caminos metabólicos considerados fundamentales en la interpretación de consumos en individuos vivos y postmortem:

- La vía que conduce a la formación de benzoilecgonina, uno de los metabolitos hallados con mayor frecuencia en personas consumidoras.
- La etilbenzoilecgonina, comunmente denominada etilcocaína o cocaetileno, es formada en el hígado por trans-esterificación enzimática de la cocaína en presencia conjunta de etanol (Hearn et al, 1991, Dean, 1991, Isenschmid, 2004, Moffat et al, 2004). Recordando la incorporación de drogas al pelo y los consecuentes hallazgos el compuesto cocaetileno debería ser incorporado y hallado como tal. La vía que conduce a la formación de cocaetileno en presencia de etanol es tres veces más rápida que la vía que conduce a la formación de benzoilecgonina.

#### **7. 10. - Esquema general de búsqueda de drogas en pelo.**

La búsqueda de drogas en pelo consta de los siguientes pasos:

- *Decontaminación o Sistema de lavados:* tiene por objeto remover droga externa adherida al pelo. En la práctica se detectan serios deterioros en la cutícula ya sea por tratamientos capilares o mala conservación, por tal motivo se recomienda realizar un exámen microscópico previa coloración con azul de metileno. Distintos autores aconsejan, los siguientes solventes para lavados:

-Diclorometano –Agua (Kintz & Mangin) \*\*\*\*

-Diclorometano e incubación a 40 °c.(Jurado)

-Diclorometano-Acetona-Metanol (Balíková- Habrdová)

-n-Hexano-Acetona-Metanol-Metanol (Balíková-Habrdová)

-Agua-Diclorometano-Agua (Ferrari –Arado)

La elección se basa fundamentalmente en las condiciones de la muestra.

- *Preparación de la muestra y extracción de la droga*
- *Purificación:* tiene por finalidad remover la matriz y otras sustancias contaminantes.
- *Identificación analítica:* de droga madre y metabolitos

Por ejemplo: Cocaína: Benzoilecgonina-cocaetileno

Relación Droga Madre Metabolito

Cocaína:Benzoilecgonina/Cocaína >0.05

- *Interpretación de resultados:*

Valores de Cut-off

Compuesto	Cut-Off ng/mg
-----------	---------------

Cocaína	0.5
---------	-----

### **7.11 - Influencia del tratamiento cosmético**

Una circunstancia importante que se ha de considerar al interpretar los resultados de los análisis de drogas en muestras de pelo es la posibilidad de que las concentraciones de las drogas sufran cambios inducidos por los tratamientos cosméticos a los que se ha sometido el pelo.

En condiciones normales, la cutícula está intacta y supone una barrera para la pérdida de las drogas incorporadas, pero algunos tratamientos cosméticos, especialmente los que emplean ácidos o bases fuertes como son la decoloración y la permanente, pueden ocasionar alteraciones en el pelo, como pueden ser, dañar la cutícula, cambiar la estructura molecular de los pigmentos como la melanina o degradar las drogas incorporadas; todo lo cual se traduce en una disminución de las concentraciones de las drogas presentes en el pelo.

De hecho, en todos los estudios realizados sobre la influencia del tratamiento cosmético en las concentraciones de drogas presentes en el pelo, los distintos autores observan una disminución en las concentraciones en las muestras tratadas cosméticamente respecto de las que permanecen sin tratar. Esta disminución fue siempre más severa en pelo decolorado que en el teñido.



## 8 - Aplicaciones del análisis de pelo

En toxicología forense el análisis de pelos tiene aplicación en:

- Procesos civiles
- Procesos criminales

### 8.1 - Procesos civiles

*Casos de divorcio:* cuando se aduce como causa de divorcio la adicción a las drogas por uno o ambos conyugues

*Casos de custodia de hijos:* para confirmar el consumo de drogas por parte del cónyuge que tiene la custodia de los hijos.

*Análisis de los recién nacidos:* para verificar el consumo de drogas por parte de la madre durante el embarazo

*Análisis de drogas en el trabajo:* En numerosos países se realiza el control de drogas en los trabajadores. Si bien durante muchos años se empleó la orina como matriz analítica para estos casos, últimamente se admitió la matriz pelo para ser usada en este tipo de situaciones.

*Causas de seguros:* Algunas aseguradoras solicitan a los aseguradores, este tipo de controles, antes de firmar una póliza, teniendo en cuenta la influencia que tiene el consumo de drogas en las expectativas de vida.

*Revisiones sanitarias y seguimiento de los tratamientos de desintoxicación:* Sirve también evaluar alternativas de tratamientos.

*Establecimiento del consumo en el pasado:* El estudio cronológico del consumo de drogas, tiene aplicación en la faz civil como criminal.

## 8.2 - Procesos criminales

*Análisis de cadáveres:* Es útil, para esclarecer la causa y forma de muerte, como así también, cuando por el estado de descomposición del cadáver, la matriz más útil disponible es el pelo.

*Pequeños traficantes (camellos):* como el consumo de droga no está legalmente penalizado en España y la posesión de pequeña cantidad de droga, para el consumo personal, no está considerado tráfico, a estos individuos les interesa, como atenuante, demostrar una adicción crónica a las drogas que les han aprehendido, y para ello los abogados defensores solicitan un análisis secuencial del cabello.(Repetto (2005)

*Presos:* Sirve tanto como para verificar el consumo en la cárcel, como así también para controlar la evolución de su rehabilitación durante su estadía en el presidio.

*Establecimiento crónico o en el pasado:* es útil cuando se pretende demostrar el consumo de drogas durante el período en el que se cometieron actos delictivos que llevaron a la imputación de un hecho a una persona.

*Integridad personal:* Es útil en algunos países para demostrar la integridad de aquellas personas que por su actividad tienen acceso a las drogas (médicos, enfermeras, farmacéuticos, funcionarios de gobierno relacionados con asuntos vinculados al tráfico de drogas, etc.)

# *Objetivos*

## 1. 1 - *Introducción*

La determinación de cocaína y o sus metabolitos en matrices no tradicionales, es un área relativamente nueva en el campo de la investigación de la toxicología forense. Las primeras publicaciones al respecto comenzaron a aparecer en la década del 80 y comienzos del 90, adquiriendo cada vez mas auge, pero la mayor parte de los trabajos encontrados en la bibliografía están referidos fundamentalmente a adictos de cocaína como así también a otras drogas de abuso, es decir en personas adictas.

Las poblaciones del noroeste argentino y el altiplano sudamericano son habitualmente consumidor de coca, típica actitud latinoamericana, vinculada con costumbres socioculturales y geográficas. El consumo normalmente se realiza mascando coca, bebiendo licores e infusiones de coca.

Las vías de ingreso de la cocaína al organismo son diferentes, según se trate de adictos o de consumidores de hoja de coca; lo que hace suponer que la sustancia en estudio para encontrarse en biodisponibilidad a pasado por distintas etapas de biotransformaciones según que ingrese por vía digestiva (cavidad bucal y estómago) o si lo ha hecho en forma endovenosa y/o intranasal; existe entonces la posibilidad que las sustancias encontradas en pelo (cocaína y sus derivados), en los casos de los consumidores mencionados difiera no sólo en el aspecto cualitativo sino también en el cuantitativo.

De comprobarse esta hipótesis se podría determinar, el predominio de una o de otra sustancia para una u otra forma de consumo, lo que significaría un gran avance en la toxicología forense, porque se daría el primer paso para quizás diferenciar a consumidores de hojas de coca y de adictos mediante el laboratorio, dando un aporte importante a las ciencias del derecho.

## 1.2 - Objetivos

- Puesta a punto de una metodología para la identificación de los metabolitos de cocaína (benzoilecgonina, BE) en una matriz no tradicional tanto para métodos de tamizaje como de confirmación

- Determinación cuantitativa de Benzoilecgonina en individuos masticadores de coca del noroeste de nuestro País y su posterior comparación con la droga madre cocaína.

- Buúsqueda nuevos metabolitos de cocaína en pelo de individuos coqueros

- Establecer un patrón de relación de metabolitos que permita discriminar un consumidor de cocaína respecto de un coqueros de datos bibliográficos.

# *Materiales y Métodos*

## **1.1- Análisis de cocaína en pelo de masticadores de hoja de coca (*Eritroxylum coca*), bebedores de te de coca y adictos a cocaína mediante RIA**

### **1.1 – Muestras**

Para la realización del trabajo, se utilizaron muestras de pelo, de personas que de una u otra forma consumen cocaína:

- 100 muestras de masticadores de hojas de coca de personas entre 20 y 40 años, residentes en el noroeste argentino, concretamente en las Provincias de Salta y de Jujuy
- 100 muestras de consumidores de infusiones de hojas de coca, (no coqueadores) de personas entre 20 y 40 años, residentes en el noroeste argentino, concretamente en las Provincias de Salta y de Jujuy
- 40 muestras de personas adictas a la cocaína, de 20 a 40 años de edad, residentes en la Provincia de Corrientes, y que practican el consumo por aspiración o por vía endovenosa.
- 2 muestras de personas entre 20 y 40 años de personas no adictas a la cocaína, ni consumidoras de infusiones de coca, ni masticadoras de hojas de coca.

Las muestras fueron tomadas por corte de pelo del vértice occipital, lo más cercano al cuero cabelludo. Los donantes son personas anónimas, a quienes se le solicitó responder una encuesta ad-hoc, (ver encuesta), donde se solicita se informe la forma y frecuencia de consumo, si consume algún otro tipo de droga, como así también dato de naturaleza socio-cultural, que puedan llegar a ser útiles.

EDAD	<input type="text"/>	PESO	<input type="text"/>	ALTURA	<input type="text"/>
SEXO	M <input type="text"/>	F	<input type="text"/>		
OCUPACION:					
GRADO DE INSTRUCCIÓN	Primario <input type="text"/>	Secundario	<input type="text"/>		
	Terciario <input type="text"/>	Universitario	<input type="text"/>		
ESTADO CIVIL	Casado <input type="text"/>	Divorciado	<input type="text"/>		
	Soltero <input type="text"/>				
HIJOS	CANTIDAD <input type="text"/>	VARON	<input type="text"/>		
		MUJER	<input type="text"/>		
PADRE	VIVE Si <input type="text"/>	No <input type="text"/>	Ocupación:		
MADRE	VIVE Si <input type="text"/>	No <input type="text"/>	Ocupación:		
HERMANOS	VIVE Si <input type="text"/>	No <input type="text"/>	Ocupación:		
MUESTRA	PELO <input type="text"/>				
	Pericraneales <input type="text"/>	Axilares	<input type="text"/>		
	Pubianos <input type="text"/>				
FECHA ULTIMO CORTE DE CABELLO	<input type="text"/>				
DESDE CUANDO CONSUME	<input type="text"/>				
FRECUENCIA DE CONSUMO	Diaria <input type="text"/>				
	Semanal <input type="text"/>				
	Mensual <input type="text"/>				
FORMAS DE CONSUMO	Infusión <input type="text"/>				
	Coqueo <input type="text"/>				
	Inyección <input type="text"/>				
	Inhalatoria <input type="text"/>				
CONSUME ALCOHOL?	Si <input type="text"/>				
	No <input type="text"/>				
LUGAR DE RESIDENCIA:					
FECHA:					



## **1.2 – Reactivos y materiales**

- Acido Clorhídrico p.a. Merck.
- Hidróxido de sodio p.a. Merck.
- Buffer de fosfato ph 6,86 Biopur.
- Alcohol metílico p.a. Anedra
- Estufa de cultivo a 35° C
- Baño María termostatzado a 50° C.
- Balanza analítica

## **1.3 – Procesado**

- Las muestras de pelo fueron lavadas dos veces con alcohol metílico, con el objeto de eliminar posibles contaminaciones externas.
- Los pelos lavados fueron secados en estufa a 36° C.
- Las muestras se cortaron con tijera en trozos lo más pequeño posible, con el objeto de exponer al máximo la médula de los pelos.
- Se pesaron las muestras de pelo.
- El material pesado se trasvasó a tubos de Kahn, y se le agregó a cada uno 1,0 ml de ácido clorhídrico 0,5 M, y se incubaron durante una noche a 50°C. en baño maría termostatzado, para liberar la droga de la matriz.
- Se trasvasó el líquido de incubación a otro tubo de Khan, y fue llevado a un pH entre 6 y 7 con hidróxido de sodio 1 M.
- Se agregaron 0,35 mililitros de buffer fosfato 0,025 M pH 6,86.
- El material así obtenido fue sometido a un radioinmunoanálisis, siguiendo las indicaciones del Kit comercial utilizado.

## **1.4 - Aplicación del kit comercial**

El análisis de las muestras se realizó utilizando un kit comercial Cocaine Metabolite – Coat-A.Count, de D.P.C. (Diagnostic Products Corporation).

### Fundamento de la Metodología aplicada:

La cocaína (benzoil, metil,ecgonina) puede perder su grupo metilo por hidrólisis, transformándose en el principal metabolito de cocaína: la Benzoilecgonina.

El procedimiento Coat-A-Count, es un radioinmunoanálisis en fase sólida, en el que la Benzoilecgonina marcada radiactivamente con  $^{125}\text{I}$ , compete, durante un período de tiempo determinado, con la benzoilecgonina de la muestra del paciente por anticuerpos específicos. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la decantación del sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción de la Benzoilecgonina marcada radiactivamente unida al anticuerpo. El conteo del tubo en un contador gamma produce un número que se convierte en una medida de la Benzoilecgonina presente en la muestra del paciente mediante una curva de calibración

Los materiales suministrados por el Kit, son los siguientes:

- Tubos de polipropileno, recubiertos con anticuerpos ovinos antibenzoilecgonina.
- $^{125}\text{I}$  Benzoilecgonina liofilizada, que se debe reconstituir con 110 ml. de agua destilada.
- Calibradores de Benzoilecgonina, marcados A a F, con conservante.  
Los calibradores se suministran en forma líquida listos para usar

Materiales requeridos pero no provistos

- Agua destilada o desionizada
- Contador gamma compatible con tubos de de 12 x 75 mm
- Probetas graduadas de 110 ml.
- Tubos de polipropileno de 12 x 75 mm para su uso como NSB (unión no específica)
- Micropipetas de 25  $\mu\text{l}$  y de 1000  $\mu\text{l}$ . Para la adición de los 25  $\mu\text{l}$

se recomienda usar una pipeta de desplazamiento de aire y punta desechable para minimizar el riesgo de arrastre .

- Gradillas de decantación – disponibles en DPC.
- Papel milimetrado logarítmico – disponible en DPC
- Vortex

### *Procedimiento analítico*

Todos los componentes deben llevarse a temperatura ambiente antes de su uso.

- *Tubos de ensayo*: Marcar cuatro tubos de ensayo de polipropileno (sin recubrir) 12 x 75 mm. Tubos T (cuentas totales) y NSB (unión no específica) por duplicado. Al ser la unión no específica en el ensayo COAT-A-COUNT característicamente baja, los tubos NSB pueden ser omitidos sin comprometer la precisión y calidad del ensayo.
- *Tubos recubiertos*: Marcar 12 tubos recubiertos de anticuerpos frente a la benzoilecgonina: A (máxima unión) y B hasta F por duplicado. Marcar tubos recubiertos de anticuerpos adicionales también por duplicado, para los controles y las muestras de pacientes

Calibradores	ng/ml
A (NSB)	0
B	100
C	300
D	900
E	2700
F	5400

- Pipetear 25 µl de calibrador cero A en los tubos NSB y A y 25 µl del resto de los calibradores y muestras de pacientes en sus correspondientes tubos. Pipetear directamente en el fondo del tubo.
- Las muestras que se esperan tengan concentraciones altas deberán diluirse con el calibrador cero.
- Añadir 1 ml de  $^{125}\text{I}$  Benzoilecgonina a todos los tubos. Mezclar en el vortex. No se debe tardar más de 10 minutos en la dispensación del trazador.
- Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Decantar. Eliminar toda la humedad visible para mejorar la precisión.
- Contar durante un minuto en un contador gamma.
- Con las lecturas de los calibradores trazar la curva de calibración y con ella obtener la concentración de Benzoilecgonina de las muestras analizadas.

### **1.5 - Método estadístico aplicado.**

A efectos de evaluar si los resultados de benzoilecgonina encontrados en las muestras de pelo de individuos adictos, consumidores de te de coca y las correspondientes a individuos coqueros se realizó un ensayo estadístico Análisis de la Varianza ANOVA que permite diferenciar si existen diferencias significativas en la concentración de benzoilecgonina entre estos tres grupos de muestras de pelo.

Se utilizó el análisis de Varianza (ANOVA) y el test de comparación de pares, Fisher LSD, con niveles de significación de 0,05 y 0,01. Se utilizó un paquete estadístico para computadoras (SYSTAT Inc.1990, versión 5.0, USA).

## **2. – Materiales y método para la determinación de metabolitos de cocaína: benzoylecgonina, metil ester de ecgonina y cocaetileno en pelo por UPLC**

### **2.1 - Toma y remisión de muestras de pelo**

En esta metodología se utilizó muestras de pelo que resultaron positivas en el ensayo RIA anteriormente descrito.

Para la recolección de las muestras de pelo se cortó en sector occipital (coronilla) bien al ras del cuero cabelludo, en lo posible 1 ó 2 grs. (en la práctica un puñado o mechón es suficiente) del pelo de los individuos coqueros.

Se tomó el extremo cercano al cuero cabelludo y se colocó sobre el papel ó cartón, se pesó y luego se abrochó con aplique de broches de tamaño apropiado y se colocó otro papel o cartón encima del anterior. Luego, se pegó y se mantuvieron las muestras al resguardarlo de la luz en papel de aluminio. El envoltorio permaneció firme y se indicó claramente la zona cercana al cuero cabelludo y la distal.

A continuación se describe la técnica empleada para el análisis de drogas en pelos para la metodología UPLC.

### **2.2 - Descontaminación:**

- Se tomó el material a analizar y se comenzó la descontaminación siguiendo el procedimiento descrito a continuación:
- Lavado con diclorometano durante 15 minutos a 37°C
- Lavado con agua destilada durante 15 minutos a 37°C
- Finalmente lavado con diclorometano durante 15 minutos a 37°C
- Los lavados fueron para posterior análisis por HPLC
- Secado del pelo colocándolo entre papeles de filtro y presionando.
- Pesado exactamente todo el material a analizar
- Cortar en segmentos de 1,2 a 1,5 cm cada uno.

### **2.3 - Preparación de la muestra. Extracción de cada uno de los segmentos en forma separada.**

- A continuación, se digirió la muestra con HCl 0,1 N a 50°C durante 24 horas, con ulterior filtrado.
- El extracto acuoso fue extraído con éter etílico, a pH alcalino utilizando una solución amoniacal al 1%, evaporado a continuación, a 35°C y retomados con 500 µL de metanol p.a.

### **2.4 - Instrumental y condiciones de corrida**

- Los extractos fueron inyectados en un equipo UPLC (Aquity Waters), con columna C18 (50 x 2,1 mm d.i)
- Tamaño de partícula 1,8 µm.
- Fase Móvil: buffer fosfato de potasio 20 mM, llevada a pH 7 con NaOH 1N.
- Flujo de fase móvil a 1 ml/min.
- Detector DAD 9695 Waters.
- Se efectuaron las respectivas curvas de calibración con estándares de pureza conocida, se aplicó el método del estándar externo usando Tetracosano.

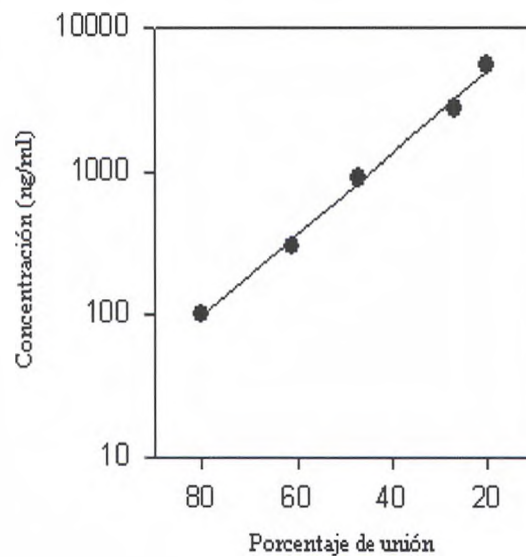
# *Resultados y Discusión*

## 1.- Resultado y discusión

### 1.1 - Puesta a punto de la metodología RIA

En la siguiente figura se presentan la curva de calibración *de la metodología RIA*.

Se observa una buena correlación entre las variables estudiadas. El coeficiente de determinación  $r^2$  fue de 0.989.



*Figura 17 Curva de calibración de la metodología RIA*

En la siguiente figura se presenta el porcentaje de muestras analizadas de benzoilecgonina en pelo individuos según su consumo

Se estudiaron 100 muestras de pelo de individuos que consumen te de coca, 100 muestras de pelo de individuos coqueadores y 40 muestras de pelo de individuos adictos.



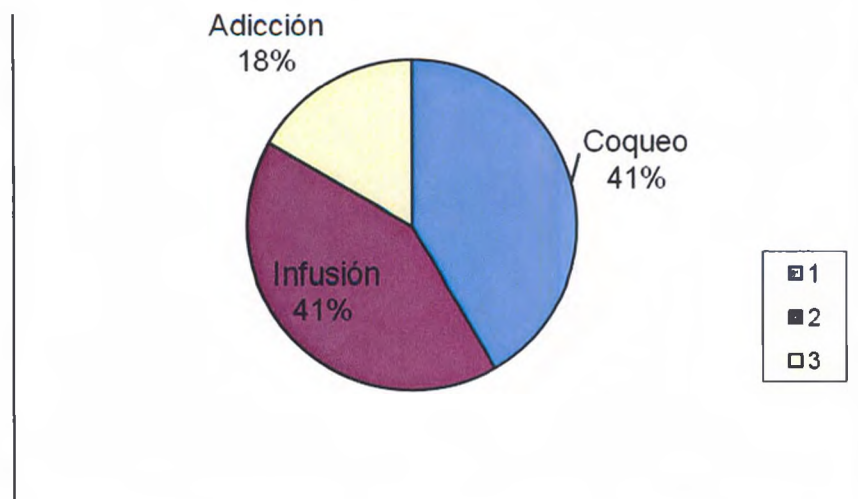


Figura 18. Porcentaje de muestras analizadas según el tipo de consumo

En la siguiente tabla se presentan los resultados encontrados de benzoilecgonina en pelo de individuos bebedores de te de coca, coqueadores y adictos a cocaína mediante RIA

Tabla N° 5 Valores hallados de benzoilecgonina en ng /ml /100 mg de pelo

Bebedores de infusión de coca		Coqueadores		Adictos	
N° muestra	Ng/ml/100mg de pelo	N° muestra	ng/ml/100mg de pelo	N° muestra	ng/ml/100mg de pelo
1	900	101	5600	201	610
2	2020	102	4700	202	730
3	2700	103	4015	203	200
4	2200	104	2900	204	70
5	3400	105	1900	205	105
6	3700	106	980	206	220
7	2500	107	5900	207	400
8	1500	108	5100	208	100
9	2900	109	4040	209	90
10	4300	110	2700	210	30
11	3940	111	2600	211	200
12	3300	112	1050	212	70
13	2700	113	5900	213	600

14	2660	114	5200	214	50
15	2940	115	4060	215	80
16	1200	116	2740	216	400
17	1100	117	2400	217	180
18	1400	118	940	218	190
19	2500	119	5800	219	90
20	2500	120	5700	220	90
21	2700	121	4700	221	160
22	3960	122	4040	222	140
23	4200	123	3500	223	210
24	3300	124	5700	224	180
25	3800	125	5700	225	105
26	2400	126	2550	226	260
27	2200	127	1400	227	120
28	1100	128	6200	228	610
29	1350	129	6800	229	70
30	350	130	6400	230	75
31	1600	131	5100	231	60
32	2430	132	4400	232	120
33	3500	133	3100	233	590
34	4180	134	2700	234	200
35	3050	135	960	235	90
36	2980	136	5500	236	120
37	2700	137	6100	237	400
38	2300	138	6350	238	70
39	2500	139	5400	239	85
40	1620	140	6400	240	490
41	1100	141	4400		
42	870	142	3580		
43	1800	143	5050		
44	500	144	5600		
45	680	145	4700		
46	1200	146	3650		
47	1700	147	1990		
48	2700	148	500		
49	2850	149	5900		
50	2400	150	6100		
51	3100	151	6400		
52	4700	152	5350		
53	3450	153	5200		
54	3300	154	6200		
55	2480	155	5900		
56	2700	156	4300		
57	2800	157	3200		
58	1200	158	5900		
59	900	159	5750		
60	1500	160	5300		
61	700	161	4800		
62	440	162	3700		

63	2250	163	3100
64	1100	164	1800
65	1700	165	520
66	2450	166	6300
67	2400	167	6100
68	2900	168	6200
69	350	169	5500
70	4800	170	5100
71	1650	171	5900
72	1300	172	6400
73	3900	173	6200
74	3000	174	5050
75	3500	175	3980
76	2400	176	2990
77	1700	177	2100
78	700	178	850
79	1700	179	5580
80	2770	180	5900
81	2400	181	4950
82	2510	182	5500
83	2700	183	4300
84	2900	184	520
85	2300	185	5960
86	1900	186	5100
87	2600	187	1800
88	3300	188	1050
89	1710	189	1400
90	1200	190	1350
91	150	191	4200
92	1360	192	3500
93	2000	193	2500
94	2400	194	1100
95	2500	195	6400
96	3470	196	5300
97	2800	197	4500
98	2550	198	3400
99	1800	199	6050
100	800	200	5160

Rango: valores de benzoilecgonina expresados en nanogramos por mililitro.

ni: es la frecuencia absoluta

Mi: es la clase, valor medio entre Li - Ls (donde Li es el límite inferior, Ls es el límite superior)

Clase =  $\frac{Li + Ls}{2}$

Ni: frecuencia acumulada

fi: frecuencia relativa (ni/total de muestras)

Fi: frecuencia relativa acumulada

Bebedores de infusiones de hojas de coca					
Rango	ni	Mi	Ni	fi	Fi
0 – 1000	12	500	11	0,11	0,11
1001 – 2000	26	1500,5	38	0,26	0,38
2001 – 3000	41	2500,5	79	0,41	0,79
3001 – 4000	16	3500,5	95	0,16	0,95
4001 – 5000	5	4500,5	100	0,05	1
5001 – 6000	0	5500,5	0	0	0
Total de Muestras	100				

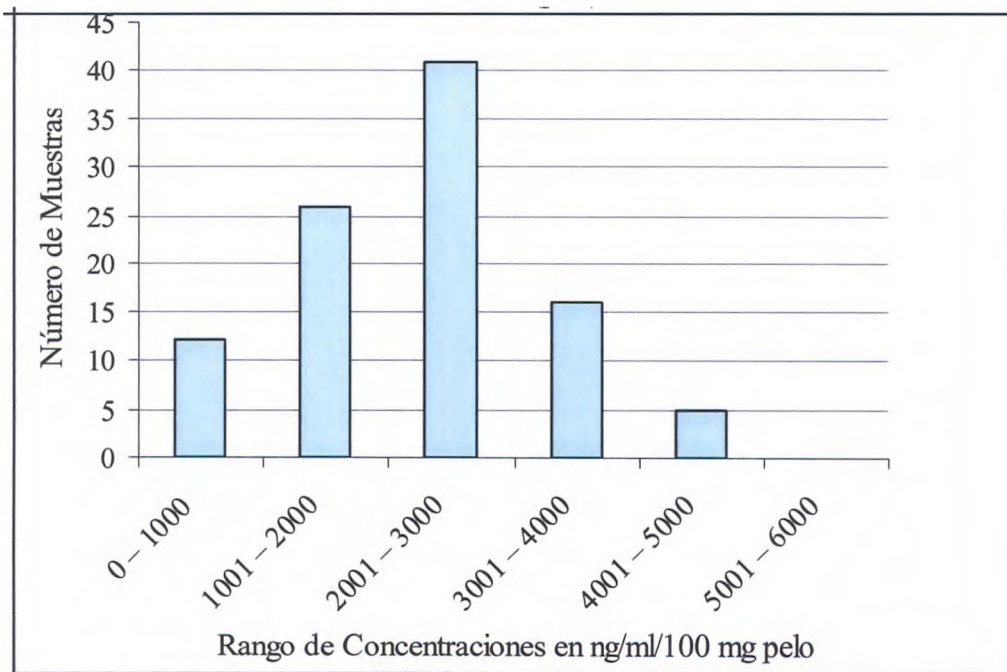


Figura 19 Frecuencia absoluta de concentración de benzoilecgonina en muestras de pelo proveniente de bebedores de te de coca

Se puede observar en el gráfico correspondiente a las muestras de pelo de personas que consumieron te de coca, que se pueden hallar valores en todos los rangos de concentraciones, menos en el último que corresponde al de mayor concentración. El rango donde se encuentra el mayor número de muestras es el que vá de 2001 a 3000 nanogramos por mililitro de Benzoilecgonina.

Mascadores de hojas de coca					
Rango	ni	Mi	Ni	fi	Fi
0 – 1000	7	500	7	0,07	0,07
1001 – 2000	10	1500,5	17	0,1	0,17
2001 – 3000	10	2500,5	27	0,1	0,27
3001 – 4000	10	3500,5	37	0,1	0,37
4001 – 5000	15	4500,5	52	0,15	0,52
5001 – 6000	32	5500,5	84	0,32	0,84
6001 – 7000	16	6500,5	100	0,16	1
	100				

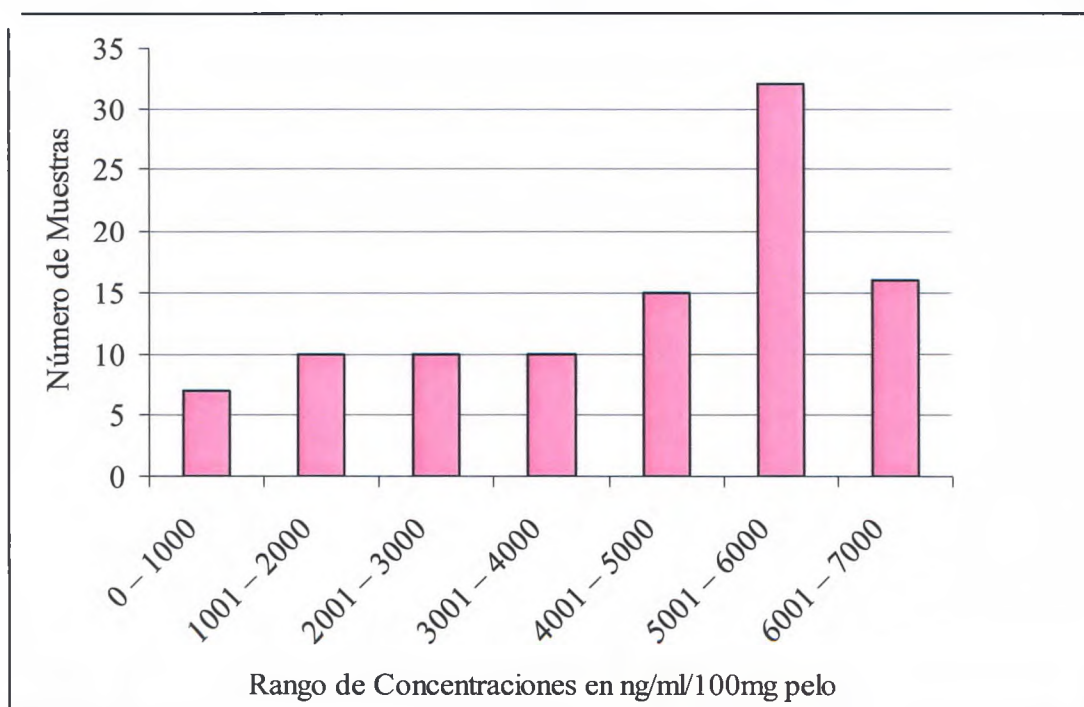
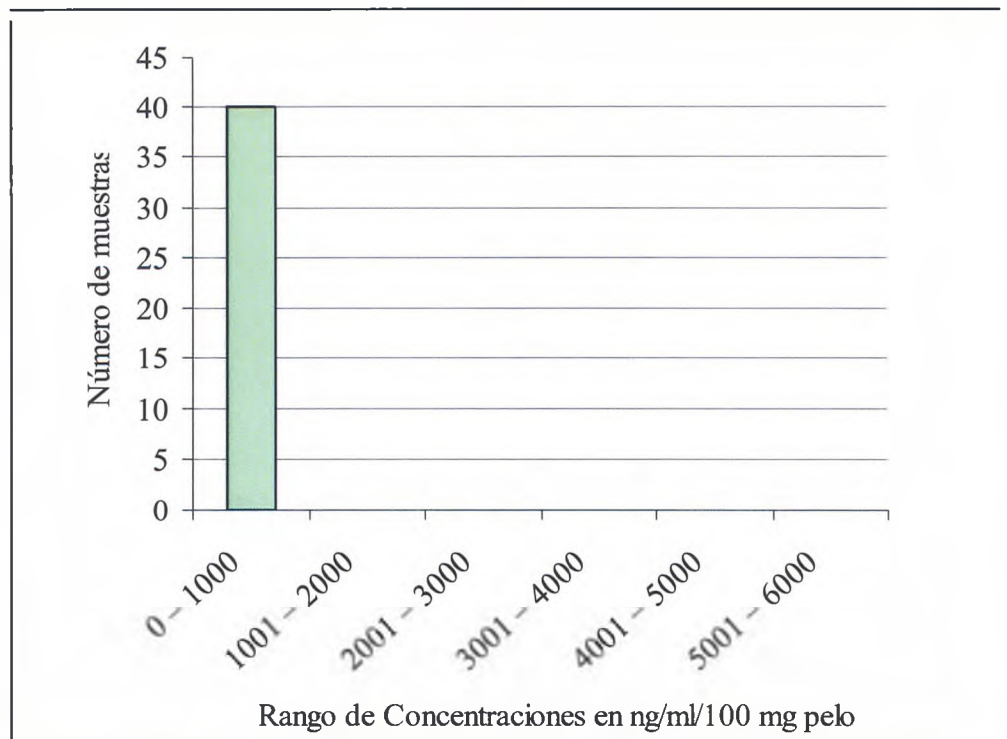


Figura 20 Frecuencia absoluta de concentración de benzoilecgonina en muestras de pelo proveniente de mascadores de hojas de coca

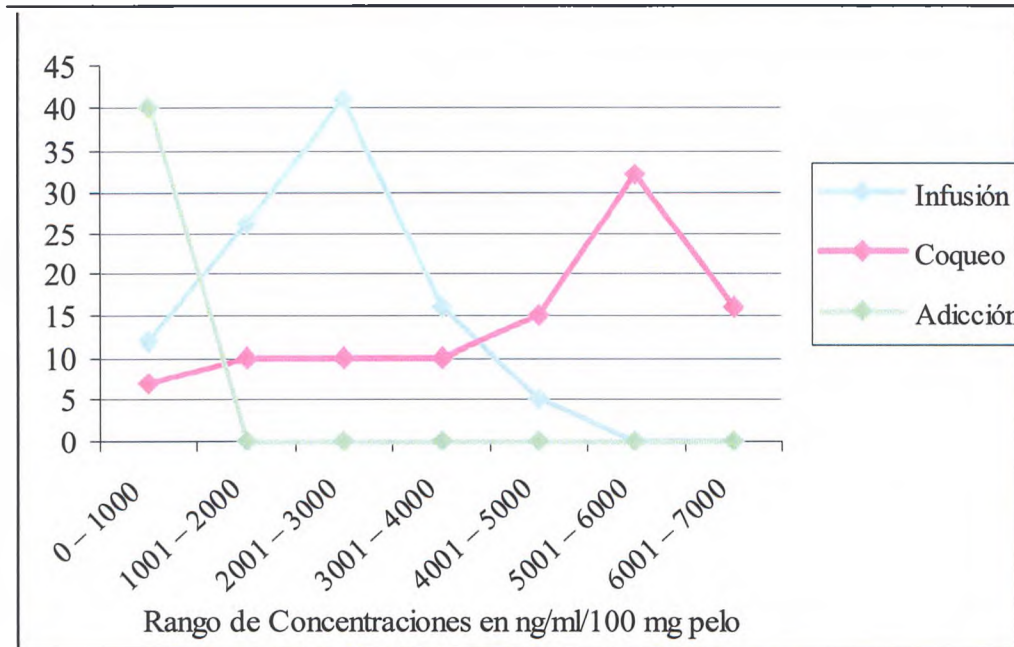
Se puede observar en el grafico correspondiente a persona que practican el Coqueo, se encuentran valores de concentraciones de Benzoilecgonina en todos los rangos, pudiéndose observar que el mayor número de muestras se encuentran en el rango de mayor concentración de Benzoilecgonina que va desde 5001 a 6000.

Adictos a la cocaína					
Rango	ni	Mi	Ni	fi	Fi
0 – 1000	40	500	40	1	1
1001 – 2000	0	1500,5	0		
2001 – 3000	0	2500,5	0		
3001 – 4000	0	3500,5	0		
4001 – 5000	0	4500,5	0		
5001 – 6000	0	5500,5	0		
	40				



*Figura 21 Frecuencia absoluta de concentración de benzoilecgonina en muestras de pelo proveniente de adictos a cocaína*

Se puede observar en el gráfico correspondiente a la personas que consumen cocaína (adictos), que los valores de Benzoilecgonina hallados en las muestras de pelo analizadas, son muy bajos con respecto a los coqueadores y los tomadores de té de coca y no superan los 1000 nanogramos por mililitros.



*Figura 22. Comparación de la concentración de benzoilecgonina en muestras de pelo proveniente de mascadores de hojas de coca, bebedores de te de coca y adictos a cocaína*

Por medio del tratamiento estadístico se puede observar que en el caso de la adicción las concentraciones de Benzoilecgonina en las muestras analizadas son menores que los que se encontraron en las muestras que corresponden a los consumidores de te de coca, y los coqueadores, encontrándose en éstos últimos valores muy elevados. También se puede observar que existe una superposición de concentraciones del derivado de la cocaína (Benzoilecgonina) en los diferentes tipos de consumo.

### 1.1.2 - Análisis estadístico de los resultados

Mediante la aplicación del Análisis de la Varianza (ANOVA) a los resultados de benzoilecgonina, se pudo concluir que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los resultados de benzoilecgonina hallados muestras de pelo de individuos adictos, los consumidores de te de coca y los coqueadores.

A continuación se presenta los resultados de la aplicación del Análisis de Varianza empleando el programa Systat.

MUESTRA N: 205 MULTIPLE R: 0.707 SQUARED MULTIPLE R: 0.500  
ADJUSTED SQUARED MULTIPLE R: .500 STANDARD ERROR OF  
ESTIMATE: 1.422

VARIABLE	COEF	STD ERROR	STD COEF	TOL	T	P(2 TAIL)
RESULTAD	0.000	0.000	0.707	1.000	14.28	0.000

#### ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
REGRESSION	412.611	1	412.611	204.110	0.000
RESIDUAL	412.389	204	2.022		



## 1.2 -Análisis de cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno en pelo de masticadores de hoja de coca (*Eritroxylum coca*)

### 1.2.1 - Análisis de cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno en pelo de masticadores de hoja de coca (*Eritroxylum coca*) mediante UPLC-DAD.

#### 1.2.1 - Puesta a punto de la metodología UPLC-DAD

En las siguientes figuras se presentan los cromatogramas de Standard de cocaína 5  $\mu\text{g/ml}$ ) y el espectro UV de la cocaína

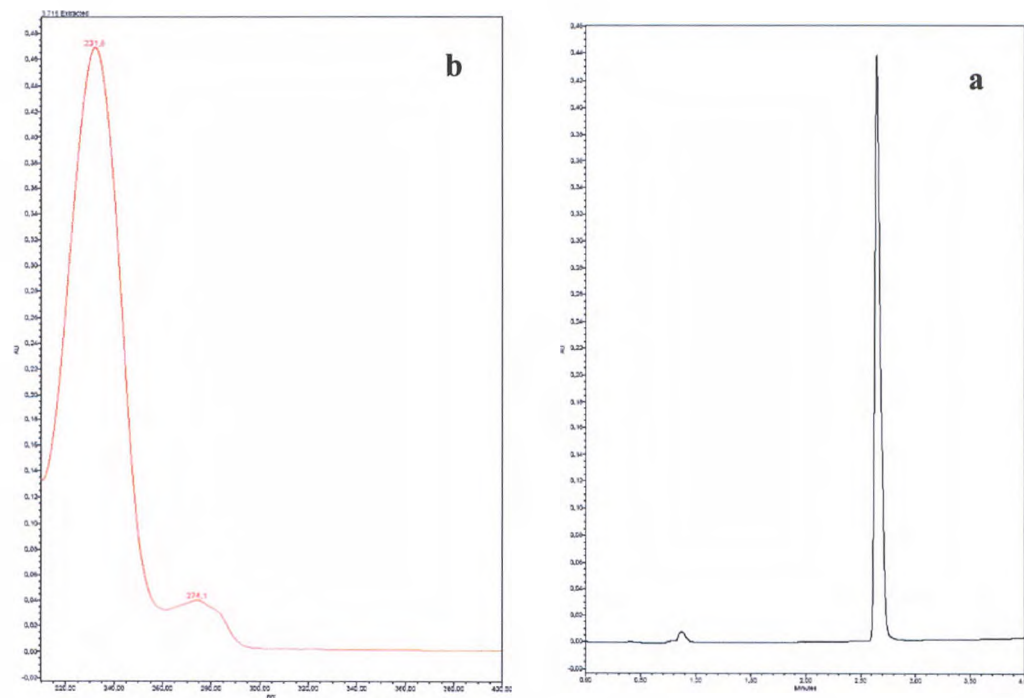


Figura 23 a) Cromatograma de standard de cocaína (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y b) espectro U.V de la cocaína. Tiempo de retención: 2.72 minutos

En las siguientes figuras se presentan los cromatogramas de Standard de benzoilecgonina (4  $\mu\text{g/ml}$ ) y el espectro ultravioleta correspondiente a benzoilecgonina

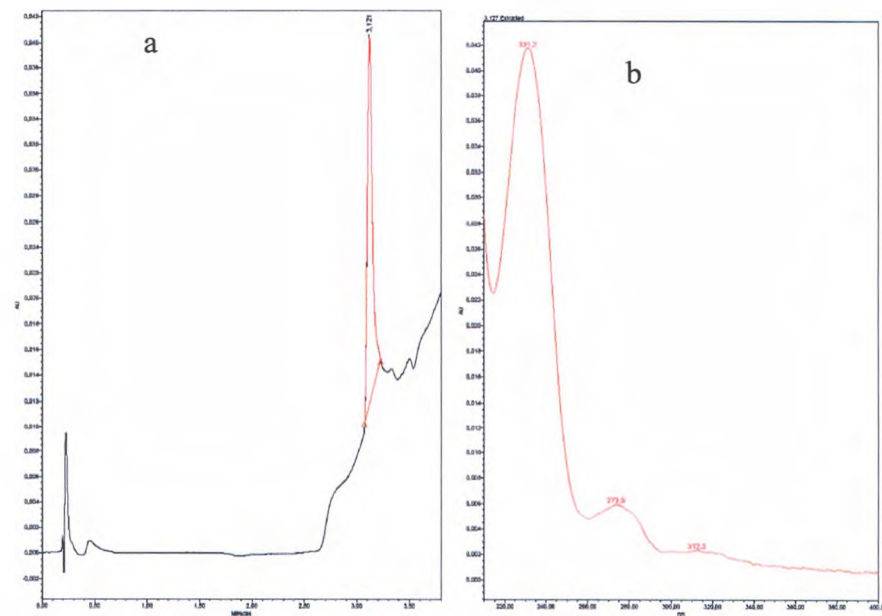


Figura 24 a) Cromatograma de standard de benzoilecgonina (4  $\mu\text{g/ml}$ ) y b) espectro U.V de la benzoilecgonina. Tiempo de retención: 3.12 minutos

Asimismo, se presentan los cromatogramas de standard y el espectro UV de cocaetileno (20  $\mu\text{g/ml}$ )

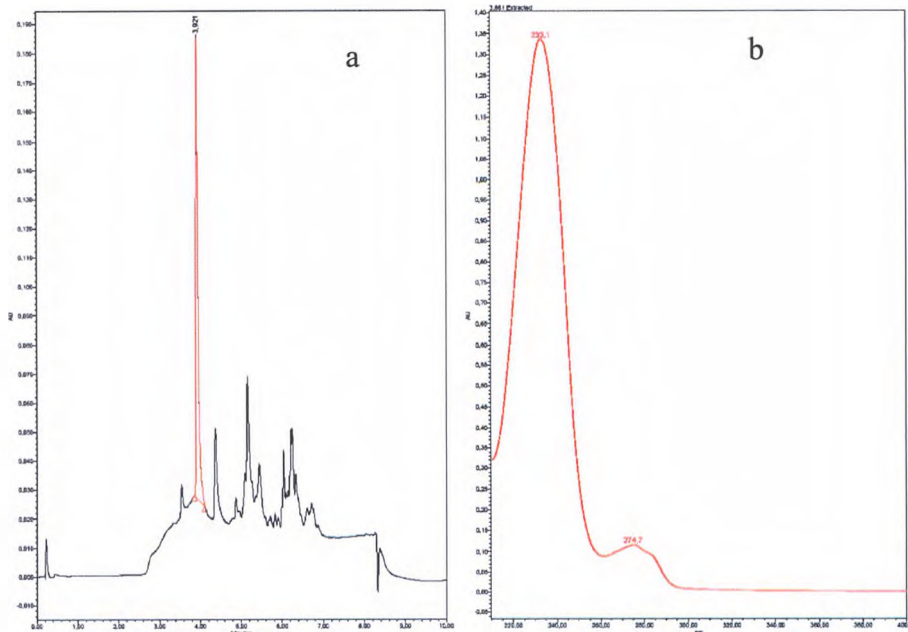


Figura 25 a) Cromatograma de standard de cocaetileno (20  $\mu\text{g/ml}$ ) y b) espectro U.V de cocaetileno, tiempo de retención: 3.92 minutos

La curva de calibración fue lineal en el rango de concentración 0,5 a 10 ng/mg.

El límite de detección (LOD) fue 0.1 ng/mg y el límite de cuantificación (LOQ) del método fue 0.5 ng/mg (relación Señal/Ruido: mayor de 3 y mayor de 10 para LOD y LOQ respectivamente).

La recuperación del método varió entre el 85-92% para los dos analitos estudiados.

### 1.2.2 - Resultados de las muestras de pelo analizadas

Como se mencionó en la sección análisis de cocaína y sus metabolitos en muestras de pelo de coqueros se analizaron por esta metodología (UPLC) las muestras que arrojaron valores de benzoilecgonina mayores a 5000 ng/100 mg pelo por el método de RIA.

De las muestras iniciales (100 muestras de pelo) se seleccionaron un total de 50 muestras que contenían valores mayores a 5000 ng/100 mg de pelo.

De las 50 muestras de pelos de coqueros fueron detectados benzoilecgonina en tres casos y Coca etileno en dos en tiempos de retención: 3.12 y 3.92 minutos respectivamente.

En la siguiente tabla se presentan los resultados de las muestras detectadas y los cromatogramas correspondientes.

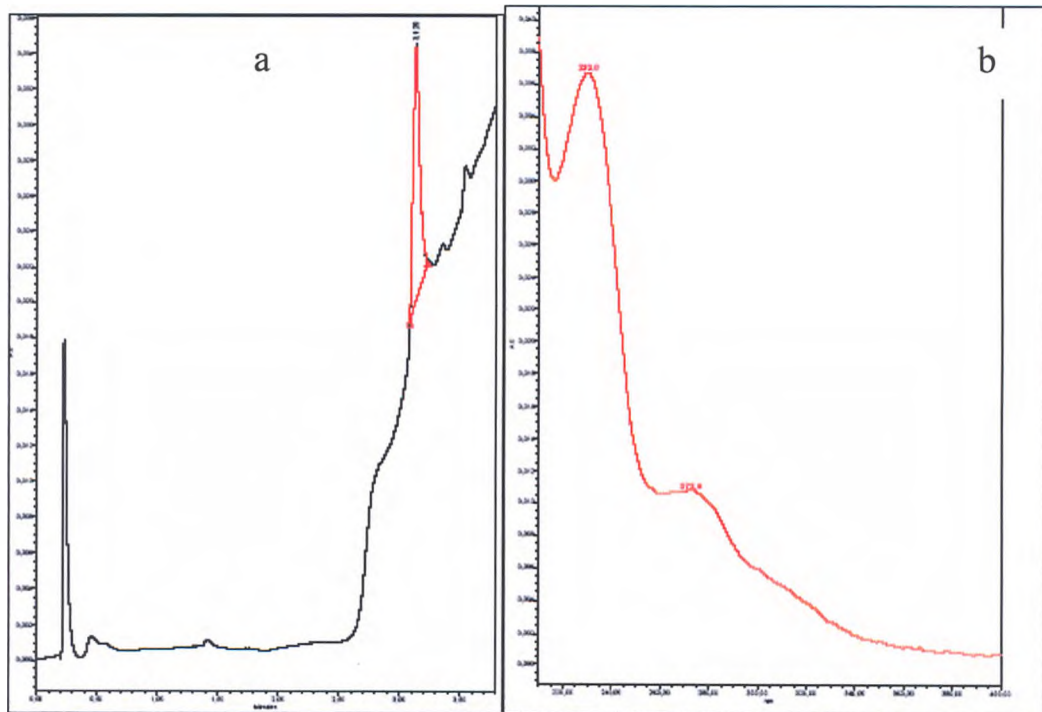


Figura 26 a) Cromatograma de una muestra de pelo con benzoilecgonina y b) espectro U.V de la benzoilecgonina

La concentración de Benzoilecgonina en las muestras de pelos.

Muestra	Conc. ng/mg
24	26± 0.01
34	1,75 ±0,05
36	0,7±0.01

La concentración de cocaetileno en las muestras de pelos.

Muestra	Conc. ng/mg
44	0,4±0.01
48	1,2±0.01

Las concentraciones para Benzoilecgonina varió entre 0.7 y 26 ng/mg, y para Cocaetileno entre 0.4 y 1.2 ng/mg de pelo. Llamativamente en pocos casos se observaron señales asignables a Cocaína, y en los casos que se se observaron solo aparecieron como vestigios (cerca del LOD)

### **1.3 - Discusión sobre los hallazgos y su comparación con los resultados de bibliografía.**

#### **1.3.1 - Consumidores de cocaína.**

Baumgartner y col (1982) utilizaron un kit RIA para detectar BZE en muestras de pelo de 13 adictos que se encontraban en un plan de rehabilitación. Este estudio informa que el consumo de cocaína por los adictos variaba en un rango de 0.04 a 5 g cocaína/mes. La concentración de BZE informada en pelo se halló en un rango entre 0.007 a 6.4 ng/mg.

Cone y col (1991) trabajaron con muestras de pelos obtenidas de 10 individuos quienes habían completado un programa de 180-días de tratamiento de recuperación de adicción. Los sujetos se identificaron como consumidores pesados; la mitad del grupo se identificaron como personas que se auto administraban la droga en forma intravenosa. Los niveles de cocaína, BZE, y EME en las muestras de pelo (cuantificados por GC/MS) variaron entre 6.4 a 19.2 ng/mg, 0.3 a 2.5 ng/mg, y trazas a 2.9 ng/mg, respectivamente. Además, cocaetileno y norcocaína fueron detectados en bajas cantidades pero detectables cuantitativamente en pelos en cerca de la mitad de los sujetos. La relación de cocaína a metabolitos variaron entre los sujetos adictos vario entre 5 a 10 para cocaína/ BZE y de 5.2 a 22 para cocaína/ EME.

Balabanova y Homoki (1987), empleando RIA para BZE, midiendo la concentración de droga en pelo de siete consumidores, informan los resultados como la suma cocaína y BZE. Ellos informan que la concentración de droga en pelo varió en un rango de 0.6 a 6.4 ng/mg. Cuando estos sujetos fueron re-analizados 3 meses después, la concentración de droga en pelo había disminuido entre 0.3 y 0.5 ng/mg.

Los autores analizaron el pelo de cinco sujetos quienes participaron en los estudios clínicos. Estos sujetos fueron clasificados como consumidores habituales pero no presentaban signos de dependencia a cocaína. La concentración de cocaína en pelo de los sujetos (cuantificadas por GC/MS) varió entre 0 a 5.7 ng/mg de pelo

Una baja correlación entre la concentración de cocaína en pelo y el uso informado por los individuos estudiados. Por ejemplo, la mayor concentración de

cocaína se encontró en los consumidores moderados (consumo de 1 a 2 veces por semana), mientras que no se detectó cocaína en pelos de sujetos que se denominaban consumidores pesados (consumo diario) (límite de detección 0.1 pelo). BZE fue encontrado en el pelo de solo un sujeto a una concentración de 0.1 ng/mg.

### **1.3.2 - Mascadores de coca.**

El pelo constituye una interesante matriz alternativa para los mascadores de hojas de coca en individuos de Sudamérica para el análisis de cocaína.

La concentración de cocaína en la planta es variable, además existe una gran variación en el uso de la coca; sin embargo si se asume que el hábito de mascar hojas de coca lleva en general unos 10 a 20 g de hojas de coca conteniendo aproximadamente 0.5 % de cocaína, peso seco, podemos estimar una dosis diaria ingerida en el mascador de coca entre 50 a 100 mg. La absorción de la droga probablemente tenga lugar en la cavidad bucal tanto como el intestino y significativos niveles de cocaína en sangre puedan ser obtenidos. Así, Holmstedt et al. 1979, Paly et al 1980 informan valores entre 100 a 200 ng/ml de sangre en la máxima absorción luego de mascar coca. Esta concentración es significativa pero menor a la informada en sujetos adictos (Jaffe 1989). De esta manera, las muestras de pelo pueden ser representativas de personas que han consumido aproximadamente una línea (aproximadamente 25 mg) de cocaína por día.

Los autores analizaron el pelo de cinco sudamericanos quienes mascaban hojas de coca diariamente. La concentración de cocaína en el pelo de estos sujetos varió entre 1.0 a 28.9 ng/mg; BZE varió de 0.3 a 4.4 ng/mg; y EME varió de 0.5 a 4.4 ng/mg. El autor informa que la concentración de cocaína fue aproximadamente 5 veces mayor a la concentración de BZE y aproximadamente 10 veces mayor que EME fue sorprendente considerando que estos individuos probablemente tengan alta concentración en plasma de BZE.

Resultó también interesante que el lavado del pelo previo al análisis no solo reduce la concentración de cocaína sino que también reduce la concentración de BZE y EME. Estos hallazgos que también fueron informados por (Cone et al. 1991), sugieren que el procedimiento del lavado del pelo usualmente empleado en el análisis del pelo probablemente extraiga analitos del cortex del pelo

### 1.3.3 - Estudios de casos control

(Henderson et al. 1993, realizaron una serie de experimentos con dosis controladas de cocaína marcada isotópicamente (benzoil-d5-cocaína-HCl) administrada intravenosa o intranasal a 25 voluntarios humanos bajo condiciones clínicas controladas.

Luego de tres días realiza la toma de muestras de sangre, sudor y pelo durante 10 meses. Todas las muestras fueron analizadas mediante GC/MS para cocaína-d5; y el metabolito benzoilecgonina-d5 (BZE-d5). El uso de droga marcada permite distinguir entre droga administrada y cocaína usada por los sujetos ya sea antes o durante el estudio.

En ambas matrices, pelo y sudor, el analito predominante fue la droga madre cocaína-d5. En contraste, BZE-d5 fue el principal analito encontrado en sangre, especialmente después de aproximadamente 2 horas. El rango de dosis de cocaína usada en el estudio (0.6 a 4.2 mg/kg) resultó en 0.1 a 5 ng de cocaína-d5 por muestra de pelo y aproximadamente un -sexto de la cantidad de BZE-d5. La mínima dosis detectable por GC/MS fue estimada en aproximadamente 25 a 35 mg de droga administrada en forma intravenosa que es aproximadamente la cantidad encontrada en una línea de cocaína. Los autores encuentran una pobre correlación entre la dosis de droga administrada y la cantidad de cocaína-d5 incorporada en el pelo. Los individuos no- Caucásicos en particular incorporan considerable mas cocaína-d5 en pelo que Caucásicos (de 2 a 12 veces, dependiendo de cómo se halla medido). Esta diferencia entre individuos no puede ser explicada por diferencias en la farmacocinética individual. Se observó una pobre correlación entre el tiempo desde la administración de la droga y la posición de la droga a lo largo del pelo. Los análisis de los segmentos de las muestras de pelo revelan que los sujetos que recibieron una única dosis de cocaína-d5 se distribuye en todo el pelo, mientras que los que recibieron múltiples dosis presentan la droga confinada en una menor área.

Además, cocaína-d5 fue detectada en pelo a las 8 horas después de administración de la droga. El pelo fue obtenido de cuatro sujetos a los 1 y 3 días después de recibir 0.6 mg/kg de cocaína-d5 intranasal; cocaína-d5 fue encontrada en



tres de los cuatro sujetos, lo cual sugiere que el sudor o sebum puede jugar un papel importante en la incorporación de algunas drogas en pelo.

Los datos cuantitativos por RIA, no nos permite efectuar otra inferencia en este sentido, ya que coexisten en la hoja de coca innumerables estructuras relacionadas al núcleo tropínico de la cocaína por lo que tal vez exista reacciones cruzadas difíciles de discriminar por el método analítico. Al menos, por la aplicación de ambas técnicas, podemos deducir que aquellos individuos con valores en RIA superiores a 50 ng/mg de pelo mostraron resultados cuantificables por UPLC-DAD.

Estudios futuros deberían estudiar la existencia de otros compuestos hallados en la hoja de coca y que podrían constituirse en “marcadores” de ingesta del alcaloide en coqueadores.

Los guarismos consignados en el presente trabajo resultan ser un poco diferentes a los consignados en la literatura. Así, Henderson et al (*eds. Edward. J. Cone, Ph.D., Michael. J. Welch, Ph.D., and M. Beth Grigson Babecki, M.A.) Hair Testing for Drugs of Abuse: International Research on Standards and Technology, 1995, p. 91-120. NIH*). Refiere varios trabajos, previamente publicados, en los que expresan que los coqueros que consumen entre 10 – 20 gramos de hoja de coca diaria presentan concentraciones de cocaína y benzoilecgonina variable, siendo la relación entre ambas mayor a 1 (COC: 1.0 - 28.9 ng/mg; BZE: 0.3 - 4.4 ng/mg). Sin embargo, los autores advierten que las etapas de lavado, previas a la extracción propiamente dicha, pueden remover tanto la COC como la BZ, de la misma médula, como se señaló precedentemente. Aunque los investigadores no lo expresan, es evidente que el grado de remoción dependerá de la magnitud del daño en la cutícula, dependiendo no solo de factores químicos debido a tratamientos capilares, sino también y tal vez, de condiciones ambientales, típicas del área geográfica en la que se practica el coqueo.

En nuestra investigación observamos una inversión en la relación de concentraciones de cocaína versus benzoilecgonina, al menos en 5 casos estudiados

Se considera también la incidencia de la vía de ingreso, tipo y/o variedad de hoja consumida en la detección de cocaína en pelo y la génesis de cocaetileno en coqueros.

En el caso de coqueros, la vía de ingreso es la oral. Se considera así un sistema de dos compartimentos: la cavidad oral y el torrente sanguíneo separados por la mucosa oral. El pH que lleva la “llopta”, adicionado al bolo de hoja de coca, incrementa notablemente el pH hasta aproximadamente once, mientras que el plasma es 7,2 – 7,4. Esta diferencia establece un gradiente de concentración elevado a favor de los alcaloides con la consiguiente facilitación de la absorción de los mismos, una pequeña parte de los alcaloides pasa al tracto digestivo donde son degradados antes de que lleguen a la circulación sanguínea por acción del ácido clorhídrico y las enzimas digestivas. En este caso se ha demostrado la prevalencia de la Ecgonina metil ester (EME) que presenta el inconveniente de su baja concentración, respecto de la BZE. Los autores que han estudiado el fenómeno tampoco pueden darle una interpretación certera a éste hecho y solo efectúan lucubraciones un tanto personales.

# *Conclusiones*

1. El presente trabajo es el primero en consignar la coexistencia de derivados de cocaína en forma conjunta a cocaetileno (marcador certero de incorporación conjunta de alcohol y cocaína) en este caso, certeramente la incorporación de productos de la hoja de coca conjuntamente con etanol, ya que estos casos analizados no corresponden a individuos adictos a la cocaína, como polvo, aislado de la hoja de coca.
2. Se observa una inversión de las concentraciones de cocaína versus benzoilecgonina, en nuestro caso, menores a 1 y en los publicados hasta hoy, iguales o mayores a 1 en la mayoría de los casos.
3. El método UPLC resulta original (hasta hoy el primero informado en la literatura universal para el análisis de estructuras relacionadas a la ecgonina en individuos coqueros) que posee la ventaja de reducir los tiempos de retención en casi diez veces respecto de la cromatografía líquida convencional.
4. Esta tesis, servirá de base para futuras investigaciones de otras estructuras, que aquí no se han considerado y que podrían constituir “marcadores” más precisos y discriminantes del consumo de cocaína respecto del de la hoja de coca en su forma de consumo habitual por los pobladores del Noroeste argentino y otras zonas del cono sur de América.

# *Agradecimientos*

*A la Universidad Nacional del Nordeste en general y en particular a la Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura, donde fui recibido con afecto y respeto como un egresado más de esta casa de altos estudios.*

*A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, donde sus profesores me enseñaron el camino de la ciencia, la honestidad intelectual y me impartieron una sólida formación en química.*

*A la Dra. Prof. Leda Gianuzzi y al Prof. Dr. Mario Raúl Delfino, por la confianza que han tenido en mí para tomar la responsabilidad de dirigirme, asesorarme y estimularme en la elaboración de esta Tesis.*

*Al Ing. Carlos D'Amico y Equipo Técnico por su colaboración en la disponibilidad del equipo UPLC, en el cual se realizó el trabajo que forma parte de esta tesis.*

*A la Sra. Prof. Alicia Edit Cunha Ferré, y a la Sra. Prof. Arquitecta Analía Piccini, por sus conocimientos que gentilmente me han brindado. Al Dr. Gustavo Alterat por la información gráfica gentilmente aportada.*

*Al Prof. Dr. Manuel Repetto de la Universidad de Sevilla, y al Prof. Dr. Luis Alberto Ferrari, a quienes debo mucho de mi formación intelectual y científica de la Toxicología General y de la Toxicología Forense en particular, pudiendo adquirir a través de ellos una nueva visión de esta fascinante Ciencia y comprender su amplia interdisciplinariedad.*

*A los Drs. Profs. Adolfo Domingo Torres, Gustavo Adolfo Aucar, Jorge Monzón, Silvia Matilde Mazza, Olga Myrian Vasek, por su confianza apoyo y estímulo.*

*A mis becarios Mg. Lic. Ramón Daniel Bordón, Lic. Wilma, Elena Ramírez, Lic. Gerardo Damián Prada y Lic. Gisella Lucila Forlín, quienes me alentaban, condicionándome, con la frase: "Ud; es nuestro maestro".*

*A mi colega Gabriela Noemí Gómez de Bondaruk y al Sr. Lisandro Osvaldo González, por la colaboración prestada en la concreción de este trabajo.*

*A mi pequeña familia en el afecto: Goya, Rosita, Alfredo y Julián, a quienes les he quitado mucho de mi tiempo.*

# *Bibliografia*

Allen Dl, Oliver Js. *The application of supercritical fluid extraction to cocaine and its metabolites in blood and urine*. *J. Anal. Toxicol.* 2000(b), 24, 228-232.

Balabanova S, Brunner H, Novak R (1987a). "RIA determination of cocaine in human hair". *Z. Rechtsmed.*, 98: 229-234.

Baumgartner Wa, Black Tc, Jones Pf, Bland Wh (1982). "RIA of cocaine in hair: concise communication". *J. Nucl. Med.*, 23: 790-792.

Baumgartner Wa, Hill Va, Bland Wh (1989). "Hair analysis for drugs of abuse". *J. Forensic Sci.*, 34: 1433-1453.

Baumgartner Wa, Hill V, (1996). "Hair analysis for organic analytes: Methodology, reliability issues, and field studies". *Publicado en Drug Testing in Hair*. Ed.: P. Kintz, CRC Press, Inc.

Bermejo-Barrera A, Strano-Rossi S (1995). "Hair and urine analysis: relative distribution of drugs and their metabolites". *Forensic Sci Int.*, 70 : 203-210.

Blank Dl, Kidwell Da (1995). "Decontamination procedures for drugs of abuse in hair: are they sufficient?". *Forensic Sci. Int.*, 70:13-38.

Burns M; Baselt Rc (1995). "Monitoring drug use with a sweat patch: an experiment with cocaine". *J. Anal. Toxicol.*, 19: 41-48.

Carrió Nélida María, " El uso de las hojas de coca entre los habitantes de la región andina" , en *Bioquímica Chaqueña, Publicación Oficial del Colegio de Bioquímicos del Chaco,Nº 5, Pag. 28, 1992 –*

Castro De La Mata, Ramiro. En "Coca y Vida en las Grandes Alturas".Cocaina 1980, Editor F.R. Jeri, D.M., F:R:C: Pay. Lima, Perú.1980, pag.257

Cirimele V, Kintz P, Majdalani R, Mangin P (1995a). "Supercritical fluid extraction of drugs in addict hair". *J. Chromatr. B Biomed. Appl.*, 673: 173-181.

Compañó Beltrán R, Ríos Castro A. *Selección y Validación de los métodos analíticos (a) y La calidad en el ámbito de los laboratorios analíticos (b)*, En: *Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos*. Síntesis S.A., Madrid, 2002.

Cone Ej, Yousefnejad D, Darwin W D, Maguire T (1991). "Testing human hair for drugs of abuse. II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug abusers and evaluation of decontamination procedures". *J. Anal. Toxicol.*, 15: 250-255.



Cone Ej, Darwin Wd, Wang Wl (1993). "The occurrence of cocaine, heroin and metabolites in hair of drug abusers". *Forensic Sci. Int.*, 63: 55-68.

Cone Ej, Hillsgrove Mj, Jenkins Aj, Keenan Rm, Darwin Wd (1994). "Sweat testing for heroin, cocaine, and metabolites". *J. Anal. Toxicol.*, 18: 298-305.

Cone Ej (1996). "Mechanisms of drug incorporation into hair". *Ther. Drug Monit.*, 18: 438-443.

Craine Je. *Latex particle agglutination techniques in immunoassay of therapeutic drugs*. En: *Analytical methods in forensic chemistry*. Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry. Ho MH, Ellis Horwood Limited, Chichester, West Sussex, Inglaterra, 1990

Chen X-H, Wijsbeek J, Veen Jv, Franke J-P, Zeeuw Ra. *Solid-phase extraction for the screening of acidic, neutral and basic drugs in plasma using a single-column procedure on Bond Elut Certify*. *J. Anal. Toxicol.* 1994(b), 18, 150-153.

Chiswell D, Mccafferty J. *Phage Antibodies: will new "policlonal" antibodies replays monoclonal antibodies?*. *Trends Botechnol.*, 1992, 10, 80-84.

Dietzen Dj, Ecos K, Friedman D, Beason S. *Positive predictive values of abused drug immunoassays on the Beckman Synchron in a veteran population*. *J. Anal. Toxicol.*, 2001, 25, 174-178.

Elliot Sp, Hale Ka. *Applications of an HPLC-DAD drug-screening system based on retention indices and UV spectra*. *J. Anal. Toxicol.*, 1998, 22, 279-290.

Flanagan Rj, Harvey Ej, Spencer Ep. *Hplc of basic drugs on microparticulate strong cation-exchange materials-a review*. *Forensic Sci. Int.* 2001, 121, 97-102.

Ferko Ap, Barbieri Ej, Digregorio Gj, Ruch E K (1992). "The accumulation and disappearance of cocaine and benzoilecgonine in rat hair following prolonged administration of cocaine". *Life Sci.*, 51: 1823-1832.

Ferrara SD, Tedeschi L, Frison G, Brusini G, Castagna F, Bernardelli B, Soregaroli D. *Drugs-of-abuse testing in urine: statistical approach and experimental comparison of immunochemical and chromatographic techniques*. *J. Anal. Toxicol.*, 1994, 18, 278-291.

Flores García I, Contreras Montero MT, Sabater Tobella J, Radovan R. *La Garantía de Calidad en Toxicología*. En: *Toxicología de Postgrado*, M. Repetto Ed. Área de Toxicología. Universidad de Sevilla. CD-ROM. Sevilla, 2002.

Gagliano, Joseph A., "Coca and environmental. Adaptation in the High Andes: An Historical Análisis of Altitudes" en *Actas del XXXVII Congreso Internacional de Americanistas*. Tomo IV, Argentina 1966. Ed. En Buenos Aires, 1968 -

García R, Moreno E, Soriano T, Roca I, Menéndez M. Screening de drogas de abuso en sangre total mediante inmunoensayo enzimático CEDIA originalmente diseñado para el análisis de orina. Aplicación a casos forenses. *Rev. Toxicol.* 2002, 19, 105-108.

Green S, Wilson J (1996). "The effect of hair color on the incorporation of methadone into hair in the rat". *J. Anal. Toxicol.*, 20: 121-123.

Hand C, Baldwin D. Immunoassays. En: *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Moffat A C, Osselton M D, Widdop B. Londres, 2004.

Harkey Mr (1993). "Anatomy and physiology of hair". *Forensic Sci. Int.*, 63: 9-18.

Henderson Gl, Harkey Mr, Zhou C, Jones Rt (1992). "Cocaine and metabolite concentrations in the hair of South American coca chewers". *J. Anal. Toxicol.*, 16: 199-201.

Henderson Gl (1993). "Mechanisms of drug incorporation into hair". *Forensic Sci. Int.*, 63: 19-29.

Henderson Gl, Harkey Mr, Zhou Ch, Jones Rt, Peyton Jacob III (1996). "Incorporation of isotopically labeled cocaine and metabolites into human hair: 1. Dose-response relationships". *J. Anal. Toxicol.*, 20: 1-12.

Herzler M, Herre S, Pragst F. Selectivity of substance identification by HPLC-DAD in toxicological analysis using a UV spectra library of 2682 compounds. *J. Anal. Toxicol.* 2003, 27, 233-242.

Hoja H, Marquet P, Verneuil B, Lofti H, Pénicaut B, Lachâtre G. Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Analytical Toxicology: A Review. *J. Anal. Toxicol.* 1997, 21, 116-126.

Holmstedt, B., Lindgren, J., Rivier, L., and Plowman, T. Cocaine in blood of coca chewers. *J Ethnopharmacol* 1 :69-78, 1979.

Hopps Hc (1977). "The biological basis for using hair and nails for analysis of trace elements". *Sci. Total Environ.*, 7: 71-89.

Jaffe, J.H. Drug addiction and drug abuse. In: Goodman, A.; Goodman, L.S.; and Gilman, A., eds. *The Pharmacological Basis for Therapeutics*. New York: Macmillan, 1989.

Janzen, K. Concerning norcocaine, ethylbenzoylecgonine, and the identification of cocaine use in human hair. (Letter.) *J Anal Toxicol* 16(6):402, 1992.

- Jones G. *Postmortem toxicology*. En: *Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 2004, Londres.
- Jurado MC. *El pelo como matriz para el diagnóstico toxicológico*. En: *Toxicología de Postgrado, M. Repetto Ed. Área de Toxicología. Universidad de Sevilla*. CD-ROM. 2002, Sevilla.
- Jurado C, Rodríguez-Vicente C, Menéndez M, Repetto M (1997a). "Time course of cocaine in rabbit hair". *Forensic Sci. Int.*, 84: 61-66.
- Jurado C, Kintz P, Menéndez M, Repetto M (1997b). "Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing". *Int. J. Legal Med.*, 110: 159-163.
- Kalasinsky Ks, Magluilo J, Jr, Schaefer T (1994). "Study of drug distribution in hair by infrared microscopy". *J. Anal. Toxicol.*, 18: 337-341.
- Kintz P, Mangin P (1995d). "Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)". *Forensic Sci. Int.*, 73: 93-100.
- Kupiec T, Slawson M, Prazst F, Herzler M. *High Performance Liquid Chromatography*. En: *Moffat AC, Osselton MD, and Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Vol 1, 3ª ed, Pharmaceutical Press, Londres, UK y Grayslake, USA, 2004*.
- Lambert WE, Van Bocxlaer JF, De Leenheer AP. *Potential of high performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology*. *J. Chromatogr. B*, 1997, 689, 45-53.
- Lores Arnaiz, J y colab., en "Fármaco-Química I- Síntesis, estructuras y propiedades de medicamentos orgánicos", Editorial Universitaria de Buenos Aires,, 1976, Pag.415 – 417. –
- Luzzi VI, Saunders AN, Koenig JW, Turk J, Lo SF, Garg UC, Dietzen DJ. *Analytic performance of immunoassays for drugs of abuse below established cutoff values*. *Clin. Chem.*, 2004, 50, 717-722.
- Machicao, Eduardo, *Coca. en coca Erytroxylum coca Erytroxylum novogranatenses "Bibliografía Comentada"*, Castro de la Mata, Ramiro y Noya, Nils. Editada por SEAMOS, Bolivia. 1995, pag.234
- Majors RE. *New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation*. LC-GC Europe, Diciembre 2001, 2-6.
- Martinez F, Poet Ts, Pillai R, Erickson J, Estrada Al, Watson Rr (1993). "Cocaine metabolite (benzoylecgonine) in hair and urine of drug users". *J. Anal. Toxicol.*, 17: 138-142.

Martz R, Donnelly B, Fetterolf D, Lassewell L, Hime G W, Heam W L (1991). "The use of hair analysis to document a cocaine overdose following a sustained survival period before death". *J. Anal. Toxicol.*, 15: 279-281.

Menéndez M. *Tendencias en Toxicología Analítica. En: Evolución, estado actual, retos y tendencias de la Toxicología al comienzo del milenio. Toxicología de Postgrado*, Repetto M. Ed. Área de Toxicología. Universidad de Sevilla. CD-ROM. Sevilla, 2000.

Michalodimitrakis M (1987). "Detection of cocaine in rats from analysis of hair". *Med. Sci. Law*, 27: 13-15.

Moeller Mr, Fey P, Rimbach S (1992). "Identification and quantitation of cocaine and its metabolites, benzoilecgonine and ecgonine methyl ester, in hair of Bolivian coca chewers by gas chromatography/mass spectrometry". *J. Anal. Toxicol.*, 16: 291-296.

Moeller Mr, Fey P, Sachs H (1993a). "Hair analysis as evidence in forensic cases". *Forensic Sci. Int.*, 63: 43-53.

Montagna M, Stramesi C, Vignale C, Groppi A, Polettini A (2000). "Simultaneous hair testing for opiates, cocaine and metabolites by GC-MS: a survey of applicants for driving licenses with a history of drug use". *For. Sci. Int.*, 107: 157-167.

Novak, M; Salemink, C.A. y Khan, I. *Biological Activity of the Alkaloids of Erytroxylum coca and Erytroxylum novogranatensis. Journal of Etnopharmacology*, Vol. 10. 1984, pag. 261 -271

Offidani C, Carnevale A, Chiarotti M (1989a). "Drugs in hair: a new extraction procedure". *Forensic Sci. Int.*, 41: 35-39.

Offidani C, Strano-Rossi S, Chiarotti M (1993a). "Drug distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts". *Forensic Sci. Int.*, 63: 105-108.

Paly, D., Jatlow, P., Van Dyke, C., Balieses, F., and Byck, R. *Plasma levels of cocaine in native Peruvian coca chewers. In: Jeri, F.R., ed. Interamerican Seminar on Medical and Sociological Aspects of Coca and Cocaine. Lima, Peru: Pan American Health Office, World Health Organization, 1980.*

Pepin G, Gaillard Y (1997). "Concordance between self-reported drug use and findings in hair about cocaine and heroin". *Forensic Sci. Int.*, 84: 37-41.

Potsch L (1995a). "On physiology and ultrastructure of human hair". *En de Zeeuw RA, Al Hosani I, Al Munthiri S, Maqhool A eds. Hair Analysis in Forensic*

*Toxicology, 1<sup>st</sup> edition. The Public Relation Department (Abu Dabhi Police), Abu Dhabi (Emiratos Árabes Unidos), pp: 1-27.*

*Reid R W, O'connor F L, Crayton J W (1994). "The in vitro differential binding of benzoylecgonine to pigmented human hair samples". J. Toxicol. Clin. Toxicol., 32: 405-410.*

*Reuschel Sa, Smith Fp (1991). "Benzoylecgonine (cocaine metabolite) detection in hair samples of jail detainees using radioimmuniassay (RIA) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)". J. Forensic Sci., 36: 1179-1185.*

*Rowsworowski de Diaz Consesco, María, "Plantaciones prehistóricas de coca en la vertiente del Pacífico" en Revista del Museo Nacional Tomo XXXIX. Instituto Nacional de Cultura, Lima 1973 –*

*Rubinson KA, Rubinson JF. Cromatografía líquida. En: Análisis Instrumental, Prentice-Hall, Madrid, 2000.*

*Schneider Gm, Meyer Lv, Herrie I (1980). "Extraction with supercritical gases". Verlag, Chemie, Weinheim.*

*Scott R P W, Chromatografic Detectors- Design, Function, and Operation. Chromatografic Sciences Series, 63, New York, 1996.*

*Segura J (1995). "Possibilities of ELISA methodologies for hair analysis". En de Zeeuw RA, Al Hosani I, Al Munthiri S, Maqhoool A eds. Hair Analysis in Forensic Toxicology, 1<sup>st</sup> edition. The Public Relation Department (Abu Dabhi Police), Abu Dhabi (Emiratos Árabes Unidos), pp: 351-369.*

*Selavka Cm, Rieders F (1995). "The determination of cocaine in hair: a review". Forensic Sci. Int., 70: 155-164.*

*Selby C. Interference in immunoassay. Ann. Clin. Biochem., 1999, 36, 704-721.*

*Smith Fp, Liu Rh (1986). "Detection of cocaine metabolite in perspiration stain, menstrual bloodstain, and hair". J. Forensic Sci., 31: 1269-1273.*

*Soriano T, Jurado C, Menéndez M, Repetto M. Improved solid-phase extraction method for Systematic Toxicological Analysis in biological fluids. J. Anal. Toxicol. 2001(a), 25, 137-143.*

*Soriano T, Jurado C, Menéndez M, Repetto M. Tissue enzymatic digestion and solid-phase extraction procedure in systematic toxicological analysis. Proceeding of TIAFT, 2001(b), Prague.*

Stewart MJ. Immunoassays. En: Clarke's Isolation and Identification of Drugs, Moffat AC, Jackson JV, Widdop B, The Pharmaceutical Press, Londres, 1986.

Strano- Rossi S, Bermejo-Barrera A, Chiarotti M (1995). "Segmental hair analysis for cocaine and heroin abuse determination". *Forensic Sci. Int.*, 70: 211-216.

Tagliaro F, Antonioli C, De Battisti Z, Ghielmi S, Marigo M (1994). "Reversed-phase high-performance liquid chromatography determination of cocaine in plasma and human hair with direct fluorimetric detection". *J. Chromatogr. A*, 674: 207-215.

Taylor EH, Oertli E, Wolfgang JW, Mueller E. Accuracy of five on-site immunoassay drugs-of-abuse testing devices. *J. Anal. Toxicol.*, 1999, 23, 119-123.

Tracqui A, Kintz P, Mangin P. Systematic toxicological analysis using HPLC/DAD. *J. Forensic Sci.*, 1995, 40, 254-262.

Valente D, Cassani M, Pigliapochi M, Vansetti G (1981). "Hair as the sample in assessing morphine and cocaine addiction". *Clin. Chem.*, 27: 1952-1953.

Wang Wl, Darwin Wd, Cone Ej (1994). "Simultaneous assay of cocaine, heroin and metabolites in hair, plasma, saliva, and urine by gas chromatography-mass spectrometry". *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 660: 279-290.

Wang Wl, Cone Ej (1995). "Testing human hair for drugs of abuse. IV. Environmental cocaine contamination and washing effects". *Forensic Sci. Int.*, 70: 39-51.

Wiegand RF, Klette KL, Stout PR, Gehlhausen JM. Comparison of EMIT® II, CEDIA®, and DPC® RIA assays for the detection of lysergic acid diethylamide in forensic urine samples. *J. Anal. Toxicol.*, 2002, 26, 519-523.

Welch Ra, Martier Ss, Ager Jw, Ostrea Em, Sokol Rj (1990). "RIA of hair: A valid technique for determining maternal cocaine abuse". *Substance Abuse*, 11: 214-217.

Welch Mj, Sniegowski Lt, Allgood Cc (1993). "Interlaboratory comparison studies on the analysis of hair for drugs of abuse". *Forensic Sci. Int.*, 63: 295-303.

Wang SM, Ling YC, Giang YS. Forensic applications of supercritical fluid extraction and chromatography. *Forensic Sci. J.* 2003, 2, 5-18.

Willard HH, Merritt LL, Dean JA, Settle FA. High-performance liquid chromatography: Theory and instrumentation (a), High-performance liquid chromatography: Methods and applications (b), Ultraviolet and visible spectrometry-instrumentation (c), Fluorescence and phosphorescence

spectrophotometry (d). En: *Instrumental methods of analysis*, Wadsworth, California, 1988.

### **Libros consultados**

“*Hair testing for drugs of abuse: International Research on Standards and Technology*” Editado por EJ Cone, MJ Welch, MB Babecki. NIH Publication No. 95-3727 (1995)

“*Drug testing in hair*”. Editado por P. Kintz. CRC Press, Boca Raton (Estados Unidos) (1996)

“*Handbook of Analytical Separations. Volume 2: Forensic Science*” Editado por MJ Bogusz. Elsevier Science. Amsterdam (Holanda) (2000)

### **Revistas**

*Forensic Science International. Special Issue: Hair Analysis as a diagnostic tool for Drugs of Abuse Investigation*. Vol. 63, nº 1-3, pp 1-316 (1993).

*Forensic Science International. Special Issue: Hair Analysis II*. Vol. 70, nº 1-3, pp 1-222 (1995).

*Forensic Science International. Special Issue: Hair Analysis*. Vol. 84, nº 1-3, pp 1-314 (1997).

*Forensic Science International. Special Issue: Selected papers from the 2nd International Meeting of the Society of Hair Testing*. Vol. 107, nº 1-3, pp 1-402 (2000).

Sachs H, Kintz P (1998). “*Testing for drugs in hair. Critical review of chromatographic procedures from 1992 (Review)*”. *J. Chromatogr. B*, 713: 147-162.

Nakahara Y (1999). “*Hair analysis for abused and therapeutic drugs (Review)*”. *J. Chromatogr. B*, 733: 161-180.

Gaillard Y, Pepin G (1999). “*Testing hair for pharmaceuticals*” *J. Chromatogr. B*, 733: 231-246.

### **Enlaces de Internet**

[www.psychedics.com](http://www.psychedics.com)

[www.nida.nih.gov](http://www.nida.nih.gov)

[www.columbialab.com](http://www.columbialab.com)