

Ensayo y optimización de métodos de extracción y mineralización para determinación de cocaína en pelo por EUV-VIS y test rápido.

María L, Di Bernardo N¹; Ronick A, Ruiz D²; Uzcateguí V, Néstor A¹; Gladys, Becerra; María Y², García F¹; Alexis R, Morales¹; Lester Y, Rodríguez V¹.

¹GITAEF Grupo de Investigación en Toxicología Analítica y Estudios Farmacológicos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida - República Bolivariana de Venezuela.

²Licenciada en Bioanálisis. Laboratorio de Análisis Instrumental. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida - República Bolivariana de Venezuela.

Correspondencia de autor. Dra. María Luisa Di Bernardo Navas. e-mail girard@ula.ve.

Lic. Ronick A, Ruiz D. e-mail: ronickruiz@gmail.com

Resumen

El presente trabajo tiene como objetivo el empleo de métodos de pretratamiento: digestión y extracción para liberar cocaína o sus metabolitos en muestras de pelo de consumidores en tratamiento de rehabilitación de la Fundación José Félix Ribas-Mérida, y determinar su concentración, mediante la técnica de Espectrofotometría de Absorción Ultravioleta-Visible (EUV-VIS) y test rápido, simulando en esta última la matriz de orina. Los extractos y digestados obtenidos fueron limpios y cristalinos. El tipo de estudio es exploratorio de contraste, con previo diseño experimental. Los resultados obtenidos muestran valores entre 10.5 y 66,2 ppm expresados en mgg^{-1} . Luego de simular la matriz de orina con los extractos y digestados conseguidos se ensayo con los test rápidos de diferentes casas comerciales, los cuales se fundamentan en una prueba de inmunoensayo con reacción antígeno-anticuerpo, obteniéndose resultados positivos para el analito de interés. Se pudo comprobar la hipótesis que la técnica de EUV-vis es aplicable para la determinación de cocaína en pelo luego de realizar el tratamiento adecuado a la misma, independientemente del estrecho límite de detección de estos equipos. Los valores reportados fueron exactos y precisos, corroborados con adición estándar y patrones certificados Merck-Alemania. De igual forma es posible simular con los extractos y digestados obtenidos la matriz de orina y poder "engañar- burlar" los test rápidos. Resultando ambos procedimientos de bajo costo y fácil aplicación en laboratorios de Toxicología de baja infraestructura.

Palabras Clave: Cocaína, metabolitos, pelo, espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible, test rápido.

Abstract***Testing and optimization of methods for extraction and mineralisation in determination of cocaine in hair by EUV-VIS and fast test.***

The present work takes the employment of methods as an aim of pretreatment: digestion and extraction to liberate cocaine or his metabolitos in samples of consumers' hair in treatment of rehabilitation of the Foundation Jose Félix Ribas-Mérida, and to determine his concentration, by means of Spectrophotometer technique of Ultraviolet - Visible Absorption (EUV-VIS) and rapid test, simulating in the latter the counterfoil of urine. The extracts and digestados obtained they were clean and crystalline. The type of study is exploratory of contrast, with previous experimental design. The obtained results show values between 10.5 and 66,2 ppm expressed in mgg-1. After simulating the counterfoil of urine with the extracts and digestados obtained I test with the rapid test of different business firms, which base on a test of immunoassay with reaction antigen - antibody, positive results being obtained for the analito of interest. The hypothesis could verify that EUV-VIS technique is applicable for the determination of cocaine in hair after realizing the treatment adapted to the same one, independently of the narrow limit of detection of these equipments. The brought values were exact and precise, corroborated with standard addiction and certified bosses Merck-Germany. Of equal form it is possible to simulate with the extracts and digestados obtained the counterfoil of urine and power " to be deceptive - to deceive " the rapid test. Turning out to be both procedures of low cost and easy application in laboratories of Toxicology of low infrastructure.

Key words: Cocaine, Metabolitos, hair, spectrophotometer of ultraviolet - visible absorption, rapid test.

Introducción

La cocaína es un alcaloide tropánico (producto de la condensación de un anillo de cinco miembros o pirrolidínico y otros de seis miembros o piperidínico con tres átomos comunes, dos de carbono y uno de nitrógeno.) que como la gran mayoría de alcaloides tiene carácter básico, contiene un nitrógeno heterocíclico, es extraído de una planta superior llamada *Erythroxylum coca Lamarck*, la cual crece en Sur América; además presenta una actividad farmacológica muy marcada. Los procedimientos utilizados para la extracción de los alcaloides se basan en la solubilidad y en la presencia del nitrógeno(N) en la molécula. La cocaína contiene una amina terciaria que hace que la base del alcaloide sea soluble en solventes orgánicos; y que forme sales solubles en agua con ácidos minerales.⁽¹⁾

La determinación de la cocaína y sus metabolitos se pueden realizar en cualquier tipo de muestra biológica. En consecuencia, es necesario separar la droga de la matriz en la que se encuentra, con el objetivo de obtener la cantidad y pureza suficiente que permitan su caracterización y cuantificación verdadera. Sin embargo, en este proceso de separación se presentan pérdidas del analito, lo que ha hecho que surjan métodos analíticos de separación cada vez más confiables, es decir que se logre obtener un mejor porcentaje de recuperación del mismo, adaptados a la disponibilidad de la muestra y a la biodisponibilidad de la droga en ésta.⁽²⁾

Las muestras biológicas empleadas tradicionalmente en la determinación de la cocaína y sus metabolitos han sido las muestras de sangre (suero o plasma) y orina, pero estas muestras presentan muchas limitantes; sin embargo el avance en la instrumentación analítica así como en las técnicas analíticas, ha dado lugar a que se utilicen otros tipos de muestras adicionales o alternativas que permitan complementar las limitantes de las muestras tradicionales. La gran ventaja de estas muestras alternativas, a excepción de la saliva, es que la droga o sus metabolitos permanecen en estas por periodos de tiempo prolongados sin alteración, lo que permite determinar la droga sin la limitante del tiempo de análisis, además que se puede establecer la cronología de consumo de forma mediata.⁽³⁻⁵⁾

Entre estas muestras alternativas se encuentran las uñas y el pelo, este último es quizás el mejor espécimen para detectar desequilibrios de minerales y toxicidades. A diferencia de las uñas, la sangre y la orina, el pelo actúa como un depósito de almacenamiento para cualquier analito. El folículo del pelo en crecimiento está ricamente alimentado por los vasos sanguíneos, y la sangre que baña el folículo es el medio de transporte tanto para los elementos esenciales como para los potencialmente tóxicos. Estos elementos son entonces incorporados a la proteína del cabello en crecimiento durante la queratinización. En consecuencia, las concentraciones de los analitos en el pelo reflejan también las concentraciones en otros tejidos corporales. ⁽⁶⁾

El análisis de pelo para determinar la presencia de drogas fue utilizado por primera vez en 1954 por dermatólogos en un caso de dermatitis tóxica por barbitúricos. Sin embargo, el uso del pelo en la toxicología forense fue introducido en la época de 1970 por Baumgartner y colaboradores, como una muestra alternativa de las tradicionales en el análisis de drogas de abuso. A partir de entonces el pelo ha recibido considerable atención ya que puede ser utilizado para la detección de consumidores habituales (es decir, crónicos) de drogas de abuso. ⁽⁷⁻⁹⁾

Además es una muestra que presenta muchas ventajas, entre las que destacan: no se afecta por la descomposición como los fluidos biológicos u otros tejidos blandos permitiendo ser almacenada casi indefinidamente sin refrigeración; no es invasiva, por lo tanto su obtención se puede realizar bajo estrecha vigilancia y sin invadir la privacidad del individuo, además se podría obtener si fuera necesario una segunda muestra de la misma persona para efectos de identificación y comparación o contraanálisis; el elemento incorporado en ella permanece estable y de forma indefinida incluso bajo condiciones adversas, lo que conlleva a la inexistencia de riesgo de falsificación por abstinencia temporal o adulteración y finalmente, el análisis proporciona información sobre el tiempo de consumo del analito y su intensidad. ^(7, 8,10)

La ventaja de este tipo de análisis sobre el realizado en otras muestras biológicas se basa en el hecho de que el tallo del pelo es un tejido sin metabolismo, por lo que estas sustancias permanecen almacenadas en el mismo prácticamente sin variación durante un largo periodo de tiempo. Tradicionalmente son practicadas la toma de exámenes de sangre, de <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

orina, radiografías, etc., pero pocas personas saben que el cabello es también una muestra de nuestro cuerpo que puede ser útil en el diagnóstico y el seguimiento del tratamiento de las enfermedades. El pelo puede ser recolectado sin traumatismo, puede ser almacenado sin que se deteriore y su contenido se puede analizar fácilmente. Por eso, el pelo es cada vez más usado como muestra de análisis mineral para diagnosticar enfermedades.⁽⁸⁾

Las trazas de metales tóxicos y hasta de drogas ilegales desaparecen de la orina, pero la evidencia permanece atrapada en el pelo. El pelo tiene la ventaja de contar con memoria a largo plazo. Es un expediente permanente, como los anillos de los árboles. El pelo absorbe los minerales tóxicos o el residuo de la droga a través de sus raíces del torrente sanguíneo. La sustancia permanece conforme crece el pelo a una velocidad de 1,25 cm por mes. Una longitud de pelo de 7,5 cm de la porción más cerca al cuero cabelludo ofrece una historia de 6 meses. En contraste, el mineral tóxico o la droga puede no mostrar ninguna pista en la orina solamente pocas horas o pocos días después.^(4, 8)

Debido a que las drogas y sus metabolitos quedan atrapados en el pelo, éste es una muy buena muestra para determinar si el consumo ha sido crónico o corresponde a un consumo reciente.

En el caso de asaltos sexuales donde la víctima ha sido drogada, un análisis de pelo es suplementario a los análisis realizados en orina o sangre. Es decir, se toman 3 cm. de pelo de la víctima y se analiza cada centímetro por separado. Si la parte que está más próxima a la cabeza es positiva y el resto es negativo para cualquier droga de abuso, significa que el consumo ha sido reciente comprobándose la versión de la víctima.^(4, 8)

Cabe destacar, que existen muchos casos donde los sospechosos creen poder burlar a la policía, rapándose todo el pelo de la cabeza, pero aquí radica la verdadera ventaja del análisis de pelo ya que cualquier fibra de cabello puede ser usada, es decir pueden usarse las cejas y pestañas, vello púbico o axilar e incluso el pelo de los brazos y piernas.

Mediante el análisis de pelo se puede establecer una correlación directa entre concentración de droga detectada en la muestra y la dosis consumida, igualmente se puede utilizar como medio de diagnóstico para establecer la severidad de la drogadicción, es decir, distinguir entre consumo bajo, moderado o alto de drogas.⁽⁴⁾

Esta capacidad para diferenciar los tres tipos de consumo es similar a la de los análisis de sangre para distinguir entre dosis terapéutica, sobredosis, o dosis por debajo de la terapéutica.

Todas estas ventajas han demostrado su aplicabilidad en diferentes campos como: toxicología (forense y ambiental), patología clínica, medicina legal, nutrición, entre otras; ejemplo de ello es el aplicado por los patólogos forenses para determinar la causa de muerte en restos cadavéricos, momificados o descompuestos. Tales como el de Napoleón que reveló la presencia de arsénico, el de Beethoven la presencia de plomo y el de momias precolombinas de más de 4000 años de antigüedad la presencia de cocaína. Otro ejemplo es que los toxicólogos pueden determinar en muestras de pelo de recién nacidos el consumo de drogas de abuso por la madre durante el embarazo. Además, en los Tribunales de justicia, puede constituir una prueba importante e incluso decisiva, ya que puede aplicarse para la determinación del consumo de drogas meses después de iniciarlo, proporcionando una perspectiva histórica del consumo. ^(4, 7,11)

Actualmente se han desarrollado métodos y técnicas analíticas para la determinación de cocaína y sus metabolitos en muestras de pelo, las cuales han resultado ser muy confiables, cumpliendo con la función de ser determinaciones analíticas complementarias, aunque no de rutina debido a que las técnicas empleadas al momento de la lectura son muy costosas. Sin embargo, en los últimos 5 años se han modificado las metodologías analíticas, principalmente en los procesos de pretratamiento del pelo con el objetivo de obtener el 100% de la droga contenida en éste. Dichos procesos de pretratamiento consisten en una serie de operaciones que tienen como objeto acondicionar la muestra para introducirla en el instrumento y medir la respectiva señal analítica. Los procesos de pretratamiento diseñados hasta el momento se han basado principalmente en dos formas de separación de la droga del pelo: la extracción de la droga empleando sustancias que destruyan la materia orgánica y dejen libre al analito tales como los métodos de digestión ácida, básica, enzimática; o la maceración de la muestra en un solvente orgánico sin destruir la materia orgánica tales como lo son los alcoholes. Sin embargo previo a escoger un proceso de pretratamiento se debe tomar en consideración la composición química de la droga a analizar, con el objetivo de utilizar el más conveniente para no destruir la misma. ^(4,12)

En la determinación de cocaína y sus metabolitos los procesos de pretratamiento más utilizados hasta el momento son: Método de digestión o mineralización y Método de extracción o maceración: ^(4, 13)

Estos se pueden llevar a cabo cumpliendo ciertas condiciones analíticas como pH, temperatura y tiempo de digestión.

Luego que se ha extraído o recuperado la droga y/o sus metabolitos, se procede a cuantificarla. Las técnicas de lectura más empleadas hasta el momento son: Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible (EAUUV-VIS), Radioinmunoensayo (RIA), Cromatografía de gases- acoplada a masas (GC- MS), EMIT (Técnica enzimática de inmunoensayo múltiple), Cromatografía líquida acoplada con un UV-VIS, Inmunoanálisis de polarización fluorescente (FPIA), entre otras. ^(7, 14, 15, 16, 17). Resultando la mas recomendada la CG ahora la UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). ⁽¹⁸⁻²⁰⁾

En base a lo expuesto anteriormente, se espera determinar cocaína ó sus metabolitos en las muestras de pelo, aplicando diferentes procedimientos de pretratamiento y ver su viabilidad al utilizar una técnica analítica de rutina como es la EUV-VIS y test rápidos diseñados exclusivamente para determinación en orina, tras la simulación de la misma con la matriz de pelo. Estas técnicas resultarían suficientes para el screening de la cocaína y sus metabolitos en muestras de pelo en laboratorios con pocos medios instrumentales. No obstante, todo resultado positivo puede realizársele una confirmación analítica, por UPLC o en su defecto por GC/MS y asegurar así la exactitud de los obtenidos por estas técnicas.

Materiales y Métodos

Población y Muestra

Se seleccionaron un total de 38 personas adultos con edades comprendidas entre 20-56 años de edad de ambos géneros (20 masculinos y 18 femeninos) consumidores de cocaína bajo tratamiento de rehabilitación en la Fundación José Félix Ribas seccional Mérida con datas de último consumo entre 10-15 días y 10 no consumidores o controles. Se realizaron al azar

pruebas de detección en orina con test rápidos obteniendo resultados negativos. Explicable por la vida media de la droga.

A todos los pacientes se les aplicó una Ficha Clínica Toxicológica: Parte A contenía la historia clínica toxicológica, y Parte B contenía una carta de consentimiento voluntaria para la obtención y estudio de la muestra.

El procedimiento para su recolección consistió en cortar con tijeras de acero inoxidable en la región occipital, bien al ras del cuero cabelludo y en su defecto vello del pecho o púbico, 1 ó 2 gramos de muestra. Se colocó sobre papel indicando claramente la zona cercana al cuero cabelludo y la distal. Posteriormente se etiquetó, rotuló y se guardó en bolsas de polietileno con cierre hermético hasta su posterior análisis.

Reactivos

Todos los reactivos químicos empleados fueron de grado analítico (Tabla 1). Para la preparación de soluciones y lavado del material de laboratorio se empleo agua desionizada de alta pureza Milli-Q ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ de resistividad), obtenida en un sistema Millipore Milli-Q Plus. Todo el material utilizado (vidrio, polietileno, entre otros) fue lavado y luego fue sumergido en una solución de HNO_3 al 20 % v/v durante por lo menos 12 horas y se mantuvo en la solución ácida hasta que se utilizó. Al momento de utilizar el material, este se enjuagó con agua desionizada y se curó con la solución a utilizar. (Ver Tabla 1)

Las soluciones utilizadas fueron preparadas como se detalla en la Tabla 2.

Equipos

Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible (UV). Marca SHIMADZU modelo UV-160. Rango de lectura del ultravioleta: 225-350nm. Cubetas de cuarzo de capacidad: 2mL y 3mL., baño de maría Heating Circulating Water Bath modelo WB6-22, rango de temperatura Ambient+5~ 100 °C, estufa MEMMERT. Temperatura máxima 220 °C (Germany), balanza digital marca DENVER, modelo APX-200 peso máximo 200g, $d= 0.1\text{mg.}$, y horno microondas convencional marca

SAMSUNG, modelo N° MW1280STC modificado para uso analítico. Test rápidos de dos casas comerciales para determinación de cocaína en orina.

Diseño de la Investigación

El tipo de estudio es exploratorio de contraste, con previo diseño experimental. (Figura 1).

Pretratamiento de las Muestras

Las muestras de pelo fueron cortadas en aproximadamente 0,5 cm de largo, y se colocaron entre 30mg y 135mg en vasos precipitados de 5mL y 10mL. Para ello se utilizó un vidrio de reloj y tijeras de acero lavadas con HNO₃ al 20% entre muestra y muestra, para evitar su contaminación. Luego se sometieron a un proceso de lavado o descontaminación con el objetivo de remover la droga adherida al pelo; para ello se les añadió 2mL de n-hexano y se dejaron sumergidas en esta solución a temperatura ambiente (TA) hasta la evaporación completa del solvente.

Mineralización ácida a TA con HNO₃ al 65%

Se le adicionaron a cada muestra 2mL de HNO₃ al 65% más 4 gotas de H₂O₂, se cubrieron con papel parafilm y se dejaron digestando toda la noche a temperatura ambiente. Luego se llevaron a un aforo de 10mL con H₂O destilada para posterior lectura.

Mineralización ácida con HNO₃ en Microondas

Se le adicionaron a cada muestra 0,5mL de HNO₃ al 65% más 4 gotas de H₂O₂. Se cubrieron con teflón perforado y se colocaron en un envase previamente preparado para contener 4 muestras sometiéndolas luego a 15 segundos de calentamiento en el horno microondas en potencia baja[700Watts]. Luego se dejaron enfriar, se llevaron a un aforo de 10mL con H₂O destilada para su posterior lectura.

Extracción con solvente orgánico: Metanol (CH₃OH)

Se le adicionaron a cada muestra 2mL, 6mL y 12 mL de CH₃OH. Se cubrieron con papel parafilm y se dejaron macerando toda la noche a temperatura ambiente (TA). Luego se

procedió a efectuar una lectura directa y una indirecta. Para esta última se evaporaron hasta sequedad los extractos alcohólicos y se retomaron con H_2SO_4 [0,1N] para luego ser leídas.

Tratamiento de las muestras

Luego de realizar el pretratamiento de las muestras se llevó a cabo el siguiente tratamiento: ⁽¹⁸⁾ La muestra se diluyó hasta 10mL con H_2O . Se tomaron 5mL y se llevaron a pH 10-12 con NH_4OH (Aproximadamente 20-30 gotas). Posteriormente se extrajo con embudo de separación por 10 minutos con el doble del solvente, es decir, con 10mL de CH_3CL . Se separó la fase orgánica de la acuosa, utilizando un papel de filtro nº4 y se agregaron 2g de Na_2SO_4 (con el objetivo de que absorba la humedad del solvente orgánico). Por último se llevó la fase orgánica hasta evaporación en baño de maría y se procedió a recuperar con H_2SO_4 [0,1N] o con patrón de concentración conocida para luego realizar la lectura.

Metodología Analítica

Para determinar las características analíticas de las muestras se utilizó la curva de la librería interna del equipo; con intervalo lineal desde 0 ppm hasta 40 ppm (Figura 2).

Las soluciones empleadas para las lecturas fueron las siguientes:

Soluciones para lectura de digestiones ácidas (Tabla 3)

Soluciones para lectura de extracciones con solventes orgánicos (Tabla 4 y 5)

La cocaína y sus metabolitos reportan espectros en el rango de ultravioleta, con una longitud de onda máxima de 233nm para cocaína y una subsidiaria en 275nm para su metabolito principal: benzoilecgonina y una máxima absorbancia en 0,430 UA. ⁽¹⁹⁾ Como se observa en la Figura 3. Espectro obtenido con el patrón de referencia disponible en nuestra unidad de investigación.

A las soluciones anteriores se les realizó un barrido entre 225 y 350nm. Las soluciones de blanco, patrón, control positivo y negativo, y muestras se trabajaron por triplicado.

Test rápido de detección de drogas de abuso individuales y múltiples.

Este test se llevo a cabo en controles positivos, controles negativos, con digestión ácida, con ácido nítrico 65% antes y después del tratamiento, y extracción con metanol. Simulando la matriz de orina. Se ajusto el pH, viscosidad y densidad.

Resultados y Discusión

Los resultados de las muestras mineralizadas a TA se aprecian en la Tabla 6. En la misma se muestran picos de longitudes de máximas y espectros de absorción para la benzoilecgonina (Figura 4), aún cuando la muestra fue diluida varias veces correspondientes a una concentración desde 426,6ppm hasta 10,5ppm (Figura 5). La ausencia del pico de cocaína puede ser por hidrólisis de la misma debido al tiempo que permaneció en un medio ácido, el cual fue de 12horas. Por lo tanto se realizó una prueba alcalinizando el medio y se observó que al añadir NH_4OH hasta obtener un pH de 11 se mantiene el pico subsidiario, pero se incrementa la absorbancia y concentración de la benzoilecgonina (Figura 6).

Los resultados obtenidos de la lectura de las muestras digeridas se presentan en la tabla 7. En los mismos no se observan ninguna longitud de onda ni espectros correspondientes a la cocaína ó benzoilecgonina ($X_{6.1}$) (Figura 7), como si se aprecia en la digestión a temperatura ambiente. Se pensó que era porque la solución digerida estaba un poco turbia, así que se eliminó filtrando previamente el digerido, pero tampoco se observaron resultados compatibles con los esperados ($X_{7.1} \rightarrow F$) (Figura 8).

En vista de esto se decidió añadirle cocaína a la muestra C_{09} y digerirla, con el propósito de obtener los resultados esperados, ya que se conocía de la presencia de cocaína en la misma y además modificar el blanco de lectura de H_2SO_4 por HNO_3 , para descartar mezclas heterogéneas y por eso la distorsión en la lectura (Tabla 8), pero de igual forma no se observo nada relacionado a los espectros de la droga y su metabolito. Así que se decidió leer la solución blanco de HNO_3 y se encontró que lo que se estaba leyendo en las muestras era esta solución (Figura 9) lo que nos llevo a concluir que la cocaína aún con un tiempo tan corto de digestión se hidroliza debido a la temperatura alcanzada durante la digestión, que es aproximadamente de 48°C . Además esto se corroboró porque al utilizar las tarjetas

instantáneas de detección de cocaína dio un resultado positivo (Figura 10) lo que indica que la concentración de cocaína presente en la muestra es igual o mayor a 300ng/mL.

En vista de que ya se tenía una matriz similar a la de orina y se sabía que la cocaína estaba presente en la muestra pero hidrolizada, se procedió a realizar su extracción aplicando el procedimiento para tratar las muestras de orina, obteniéndose los resultados de la Figura 11, en los cuales se observa una longitud de onda y absorbancia máxima de 232,4nm y 0,917%abs correspondientes a la cocaína añadida, y un pico subsidiario de 273nm y 0,198%abs. Esta solución presenta una concentración de cocaína de 21,330ppm; y se utilizó como patrón para los análisis subsiguientes.

El procedimiento de extracción también se le aplicó a las muestras controles, y la lectura se llevo a cabo de dos formas, la primera retomando con $H_2SO_4[0,1N]$ en donde no se observa ningún pico, y la segunda aplicando la prueba de adición estándar, empleando como referencia el patrón preparado anteriormente en el cual se observa en su segunda lectura, realizada luego de unos 30 minutos, una disminución de la absorbancia, aunque mantenga la misma longitud de onda máxima (Tabla 9 y Figura 12), lo que refleja un inicio de hidrólisis de la cocaína; los resultados controles positivos se muestran en la Tabla 10 y Figura 13, en donde observamos concentraciones alrededor de los 3ppm, correspondientes a 0,22ppm en 100g de pelo, lo que corrobora la aplicación del método usando pruebas de adición para determinar concentraciones muy bajas en las muestras de pelo.

Previo a la lectura del control negativo se realizó una tercera lectura del patrón (C_{09} +Control positivo) presentándose los resultados en la Tabla 11 y Figura 14. Al analizar los resultados del control negativo observamos que aunque hubo un incremento en la absorbancia y en la concentración, y se mantuvo la longitud de onda, al revisar el espectro no se observó el característico de la cocaína y su metabolito (Tabla 12 y Figura 15) y aunque se diluyó tampoco se observó (Tabla 13 y Figura 16). Lo que nos confirma que es un control negativo. Además el incremento exagerado se puede deber a contaminación de las cubetas.

Extracción con metanol y metanol alcalino

Los resultados obtenidos con un volumen del solvente y cantidad de muestra estándar se expresan en la tabla 14 y Figuras 17→20. En ellos se observa que realizando la lectura directa del macerado así como la lectura luego de ser evaporada y retomada la muestra, no se aprecian espectros ni longitudes de onda, ni absorbancia correspondientes a la cocaína o la benzoilecgonina, aún cuando la muestra estuviese desde muy concentrada hasta muy diluida, además no se llegó a ver un espectro que concordara con la droga en análisis, ni siquiera al cambiar de muestra para descartar ausencia en una de ellas. Estos resultados también se apreciaron utilizando metanol alcalino, lo que nos permite deducir que aún estableciendo un medio adecuado para la extracción de la cocaína, esto no ocurre con estos solventes al momento de realizar la lectura por la técnica de espectrofotometría UV-visible.

Los resultados anteriores fueron constantes aún macerando una cantidad de muestra y un volumen de solvente mayor, para ambos métodos de extracción, y se pueden apreciar en la Tabla 15 para el metanol, y en la Tabla 16 para el metanol alcalino. La única forma de modificar los resultados anteriores es añadiendo, luego de retomar, soluciones patrones de cocaína preparados a partir del solvente utilizado en la maceración.

Extracción con etanol y etanol alcalino

Los resultados obtenidos para esta extracción, son similares al de la extracción con los solventes anteriores, es decir se observan resultados no concordantes con los esperados para la determinación del analito.

El porcentaje de recuperación y pérdida se determinó preparando un patrón y realizándole el mismo procedimiento aplicado a las muestras, lo que arrojó una recuperación de 14,90625 mg con un porcentaje de recuperación del 99.38% y una pérdida de un 0.72%, lo cual refleja confiabilidad en el método empleado.

Conclusiones

La técnica de Espectrofotometría de Absorción Ultravioleta-Visible, permite determinar la concentración de la droga en el pelo, una vez transcurrida la vida media de las mismas.

Se evidenció que se puede obtener la liberación de la droga ó sus metabolitos mediante el método de pretratamiento de digestión ó mineralización ácida de la muestra de pelo.

Se pudo comprobar la hipótesis que la técnica de Espectrofotometría de Absorción Ultravioleta-Visible es aplicable en las muestras de pelo luego de realizar el pretratamiento debido a que se obtiene una matriz similar a la de orina.

Se encontraron variaciones en la estabilidad de la cocaína y sus metabolitos, debido a que la droga se hidroliza después de la digestión, tanto a temperatura ambiente como en microondas. Por esta razón es necesario aplicar métodos de tratamiento similares a los utilizados en las muestras de orina. Además el alcalinizar el medio permite un incremento en la absorbancia.

El método de tratamiento por pruebas de adición estándar permitió determinar concentraciones alrededor de los 3ppm en las muestras retomadas, correspondientes a 0,22ppm en 100g de pelo, lo que corrobora la aplicación del método para determinar concentraciones muy bajas en las muestras de pelo.

Se determinó que al crear una matriz similar a la de las muestras de orina, se puede utilizar la técnica de inmunoensayo: test rápido o tarjetas instantáneas de detección de drogas de abuso individuales y múltiples, solo si las concentraciones de cocaína en las muestras son iguales ó superiores a 300 ng/mL, tal como lo reportan las mismas en sus instrucciones. Ambos test rápidos independientemente de la casa comercial demostraron tener la sensibilidad reportada.

Se obtuvo un porcentaje de recuperación de 99,38% lo cual refleja confiabilidad desde el pretratamiento hasta la lectura, sin embargo se deben realizar estudios posteriores para optimizarlo.

Agradecimientos

Agradecemos la receptividad y colaboración de los pacientes bajo tratamiento de rehabilitación de la Fundación José Félix Ribas del Estado Mérida-Venezuela al cedernos voluntariamente y bajo consentimiento previo las muestras que hicieron posible la realización de este trabajo. No olviden que un mundo sin drogas es posible.

A la memoria de **Alix Elodia Depablos de Delgado**. Sabias que estábamos en estos ensayos mas no te dio tiempo de ver este trabajo concluido, hoy lo compartimos contigo. Para nosotros la satisfacción de haberlo logrado, para ti, nuestro recuerdo eterno.

Tabla 1. Reactivos utilizados en la investigación

Reactivo	Características			Casa Comercial
	Fórmula	Pureza (%)	PM (g/mol)	
Agua desionizada	H ₂ O	-	-	-
N-hexano	C ₆ H ₁₄	95	86,18	Riedel-deHaën
Acido nítrico	HNO ₃	65	63,01	Riedel-deHaën
Peróxido de hidrogeno	H ₂ O ₂	35	34,01	Riedel-deHaën
Acido sulfúrico	H ₂ SO ₄	95-97	98,08	Fluka, Riedel-deHaën
Ácido clorhídrico	HCL	37	-	-
Metanol	CH ₃ OH	-	32,04	Científica andina
Amoniaco	NH ₃	-	17,03	BDH.
Etanol	C ₂ H ₅ OH	96-98	-	Científica andina.
Clorhidrato de cocaína comercial	C ₁₇ H ₃₁ NO ₄ HCL	98	-	Merck
Tiras de pH		Rango de 1→14		Macherey-Nagel. Germany
Cloroformo	CH ₃ CL	-	-	Der diagnósticos, Laboratorio de bioquímica.
Sulfato de sodio anhidro	Na ₂ SO ₄	-	-	Científica andina.

Tabla 2. Soluciones utilizadas

Solución	Preparación
HNO ₃ al 20%	Diluir 153,8mL de HNO ₃ al 65% en 1L de H ₂ O.
HCL[0,1N]	Diluir 0,8mL de HCL al 37% en 100mL de H ₂ O.
H ₂ SO ₄ [0,1N]	Diluir 1,40mL de H ₂ SO ₄ al 96% en 500mL de H ₂ O.
HNO ₃ al 3,25%	0,5mL de HNO ₃ al 65% en 10mL de H ₂ O.
Patrón de cocaína(P _A)	Pesar 10,12mg de clorhidrato de cocaína y diluir en 100mL de CH ₃ OH. Medir 1mL de la dilución y diluirlo en 10mL de H ₂ SO ₄ [0,1N]
Patrón de cocaína(P _M)	Pesar 19,65mg de clorhidrato de cocaína y diluir en 100mL de CH ₃ OH. Medir 1mL de la dilución y diluirlo en 10mL de CH ₃ OH
Patrón de cocaína(P _E)	Pesar 10mg de clorhidrato de cocaína y diluir en 100mL de C ₂ H ₅ OH. Medir 1mL de la dilución y diluirlo en 10mL de C ₂ H ₅ OH

Tabla 3. Soluciones utilizadas durante la lectura de digestiones ácidas

	Solución	Solución de la cubeta
Blanco	H ₂ SO ₄ [0,1N] HNO ₃ al 3,25%	3mL
Patrón	P _A	3mL
Control	Pool de muestras de PNC(-) Pool de muestras de PC(+)	1mL muestra diluida+ 2mL H ₂ SO ₄ [0,1N] 1mL muestra diluida+ 2mL H ₂ SO ₄ [0,1N]
Muestra		1mL muestra diluida+ 2mL H ₂ SO ₄ [0,1N]

Tabla 4. Soluciones de lectura directa

	Solución	Procedimiento
Blanco	▪ CH ₃ OH. ▪ CH ₃ OH a pH:11 ▪ C ₂ H ₅ OH	3mL
Patrón	P _M P _E [10ppm]	3mL
Control	Pool de muestras de PNC(-)	▪ Sin diluir: 3mL ▪ Diluida: 1mL de muestra control+ 2mL de solvente.

Tabla 5. Soluciones de lectura indirecta

	Solución	Procedimiento
Blanco	H ₂ SO ₄ [0,1N]	3mL
Patrón	P _A	3mL
Control	Pool de muestras de PNC(-)	Evaporada y recuperada con: ▪ 3mL de H ₂ SO ₄ [0,1N] ▪ 3mL de P _A

Tabla 6. Mineralización a TA con HNO₃ al 65%

Muestra	Blanco	Procedimiento	Lectura	[BZE]
C ₀₁	H ₂ SO ₄ [0,1N]	C ₀₁ (3mL)	298,8nm 0,765%abs	↑[C ₀₁]
C _{01d1}	H ₂ SO ₄ [0,1N]	C ₀₁ (1mL)+ H ₂ SO ₄ [0,1N] (2mL)	275,8nm-0,096%abs	426,60ppm
C _{01d2}	H ₂ SO ₄ [0,1N]	C _{01d1} (1mL)+ H ₂ SO ₄ [0,1N] (2mL)	275,0nm-0,170%abs	66,17ppm
C _{01d3}	H ₂ SO ₄ [0,1N]	C _{01d2} (1mL)+ H ₂ SO ₄ [0,1N] (2mL)	275,6nm-0,088%abs	34,25ppm
C _{01d4}	H ₂ SO ₄ [0,1N]	C _{01d3} (1mL)+ H ₂ SO ₄ [0,1N] (2mL)	275,6nm-0,088%abs	34,25ppm
C _{01d5}	H ₂ SO ₄ [0,1N]	C _{01d4} (1mL)+ H ₂ SO ₄ [0,1N] (2mL)	275,6nm-0,027%abs	10,5ppm
C_{01d6}	H₂SO₄ [0,1N]	C₀₁(1mL) + H₂SO₄ [0,1N] (2mL) + gotas de NH₄OH → C_{01d6} pH=11	274,6nm0,277%abs	107,82ppm

Leyendas:

d=diluida 1 vez/ **dn**=diluida 1 vez de d_{n-1}// **Lectura**: longitud de onda máxima- absorbancia máxima// **nm**: nanómetros// **%abs**: porcentaje de absorbancia// **BZE**: benzoilecgonina// **ppm**: partes por millón=µg/mL=mg/L

Tabla 7. Lectura de digestión en microondas.

Muestra	Blanco	Procedimiento	Lectura
X _{6.1}	H ₂ SO ₄ [0,1N]	X _{6.1} (100µL) en 10mL H ₂ SO ₄ [0,1N]	244nm-0,537%abs
X _{6.1} →F	H ₂ SO ₄ [0,1N]	X _{6.1} (3mL)	245,2nm-0,432%abs
X _{7.1} →F	H ₂ SO ₄ [0,1N]	X _{7.1} (3mL)	248,0nm-0,401%abs

Tabla 8. Lectura de muestras digeridas variando el blanco de lectura

Muestra	Blanco	Procedimiento	Lectura
C ₀₈	HNO ₃ al 3,25%	C ₀₈ (3mL)	NPA
C ₀₉	HNO ₃ al 3,25%	C ₀₉ (3mL)	NPA
B HNO₃	H ₂ O	HNO ₃ al 3,25% (3mL)	NPA

Tabla 9. Concentración de muestra C09. Segunda lectura

Nº de lecturas	Absorbancia	Concentración
1	0,897%	20,872ppm
2	0,897%	20,858ppm
3	0,897%	20,860ppm
X	0,897%	20,865ppm

Tabla 10. Concentración de control positivo

Nº de lecturas	Absorbancia	Concentración
1	1,024%	23,808ppm
2	1,023%	
3	1,024%	
X	1,024%	

Tabla 11. Concentración de muestra C09+Control positivo

Nº de lecturas	Absorbancia	Concentración
1	0,970%	22,564ppm
2	0,970%	22,567ppm
3	0,970%	22,572ppm
X	0,970%	22,568ppm

Tabla 12. Concentración de muestra control negativo

Nº de lecturas	Absorbancia	Concentración
1	1,268%	29,495ppm
2	1,267%	29,472ppm
3	1,267%	29,461ppm
X	1,267%	29,476ppm

Tabla 13. Concentración de muestra control negativo diluido

Nº de lecturas	Absorbancia	Concentración
1	0,362%	8,4185ppm
2	0,354%	8,2339ppm
3	0,354%	8,2368ppm
X	0,356%	8,2964ppm

Tabla 14. Extracción con Metanol

Numero	Blanco	Procedimiento	Lectura
1.2	CH ₃ OH(3mL)	X _{1.2} (3mL)	NPA
1.2 _{d1}	CH ₃ OH(3mL)	X _{1.2} (1mL)+ CH ₃ OH (2mL)	NPA
1.3 _{d1}	CH ₃ OH(3mL)	X _{1.3} (1mL)+ CH ₃ OH (2mL)	NPA
C _{03d1}	CH ₃ OH(3mL)	XC ₀₃ (1mL)+ CH ₃ OH (2mL)	256nm -1,662%
C _{03R}	H ₂ SO ₄ [0,1N]	XC _{03Δ} + H ₂ SO ₄ [0,1N] →F	253nm -1,813%
1.2 R	H ₂ SO ₄ [0,1N]	X _{1.2Δ} + H ₂ SO ₄ [0,1N] (2mL)→F	NPA
1.3 R	H ₂ SO ₄ [0,1N]	X _{1.3Δ} + H ₂ SO ₄ [0,1N] (2mL)→F	NPA

Leyendas: R=20 min en baño de maría y se retomó con 2ml con H₂SO₄ [0,1N] (filtrado en caso necesario)// d=diluida 1 vez →1 ml X + 2ml CH₃OH// d1=diluida 1 vez de d// NPA= no se observó picos de longitud de onda máxima.

Tabla15. Lecturas variando cantidad de muestra y volumen de CH3OH

Nº	Blanco	Procedimiento	Lectura
X _A	CH ₃ OH	(3mL)X _A	↑[X _A]
X _{Ad1}	CH ₃ OH	X _A (1mL) + CH ₃ OH(2mL)	255,68nm - 1,379%
X _{AS_m}	CH ₃ OH	X _{Ad1} (0,5mL) + P _m (1mL)	255,68nm - 0,826%
X _{AS_{m d1}}	CH ₃ OH	X _{AS_m} (1,5mL) + CH ₃ OH(1mL)	↑[X _{AS_{m d1}}]
X _{AS_{m d2}}	CH ₃ OH	X _{AS_{m d1}} (1mL) + CH ₃ OH(2mL)	240nm - 2,499%
X _{AR}	H ₂ SO ₄ [0,1N]	X _{Ad} + (3mL) A ₂ SO ₄	274nm - 0,763%
X _{AR d1}	H ₂ SO ₄ [0,1N]	X _{AR} (0,5mL) + H ₂ SO ₄ [0,1N] (0,5mL)	255,0nm - 0,214%
X _{AR S_A}	H ₂ SO ₄ [0,1N]	X _{AR} (0,5mL) + P _A (0,5mL)	254,2nm - 0,087%
			230,6nm - 0,251%

Leyendas:

X_A=273 mg de cabello en 10 mL de metanol// R=evaporada en baño de maría y retomada con H₂SO₄ [0,1N] (5mL)// S_m=salpicada con P_m // S_A= salpicada con P_A (cocaína+ CH₃OH)// P_m= patrón de cocaína en CH₃OH [19,65ppm] //P_A= patrón de cocaína en H₂SO₄ [0,1N] [10,12ppm]

Tabla 16. Lectura variando cantidad de muestra y volumen de CH3OH a pH11

Nº	Blanco	Procedimiento	Lectura
X _B	CH ₃ OH	(3mL)X _B	296,0nm - 1,712%
X _{Bd1}	CH ₃ OH	X _B + CH ₃ OH	296,0nm - 0,899%
X _{BR}	H ₂ SO ₄ [0,1N]	X _{BΔ} + (3mL)H ₂ SO ₄ [0,1N]	254,4nm - 0,191%
X _{BR d1}	H ₂ SO ₄ [0,1N]	X _{BR} + P _m	231,2nm - 0,269%

Leyendas:

X_B=231,7 mg de cabello en 12 ml de metanol alcalino// R=evaporada en baño de maría y retomada con H₂SO₄ [0,1N] (5mL)// S_m= salpicada con P_m// P_m= patrón de cocaína en CH₃OH [19,65ppm]

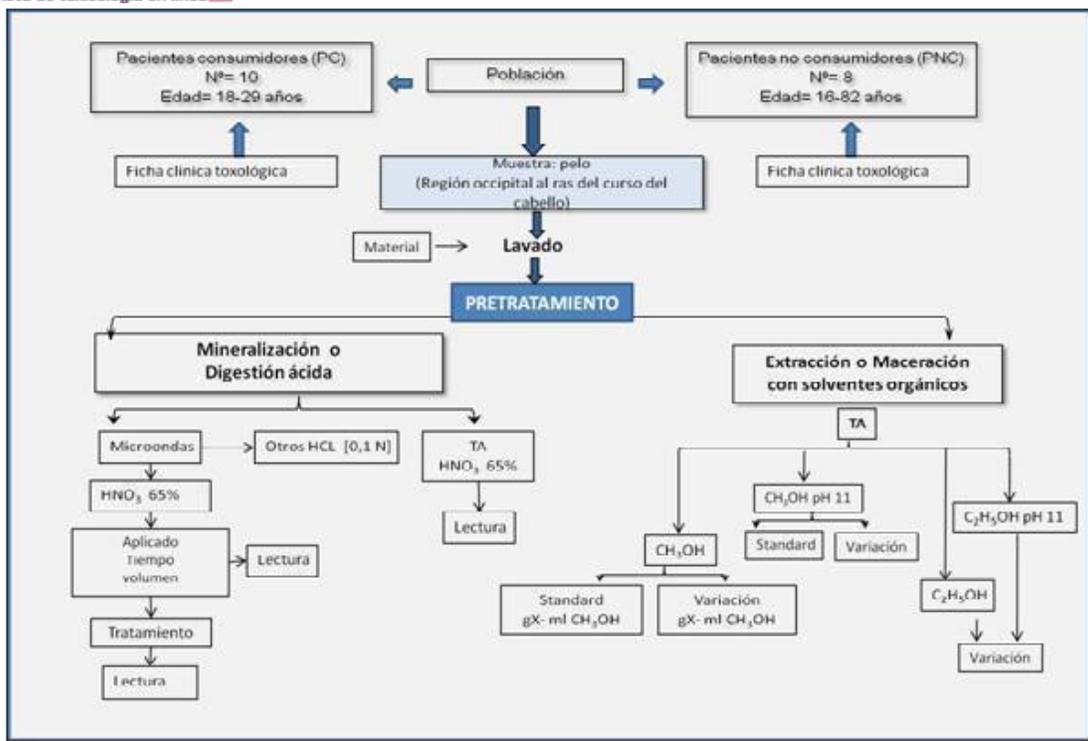


Figura 1: Diseño Experimental

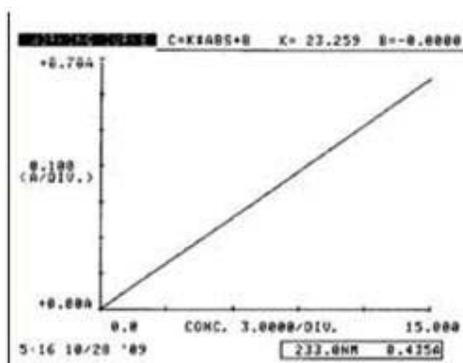


Figura 2: Curva de Calibración

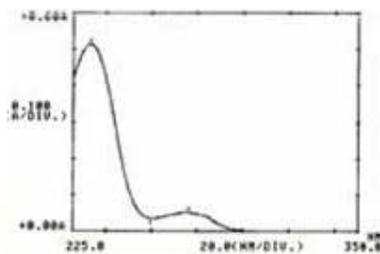


Figura 3: Patron de Cocaina

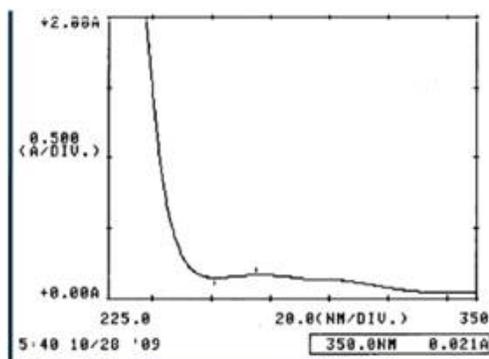


Figura 4 : Muestra C01d2
Lectura: 275,0nm-0,170%abs
[Benzoilecgonina]: 66,17ppm

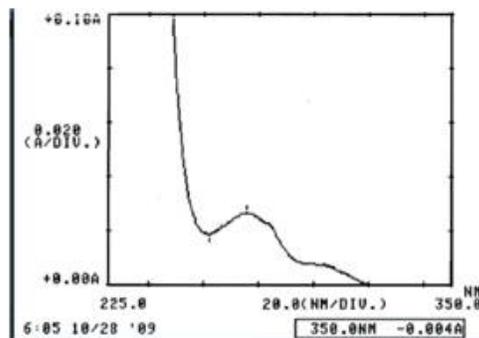


Figura 5: Muestra C01d5
Lectura: 275,6nm-0,027%abs
[Benzoilecgonina]: 10,5ppm

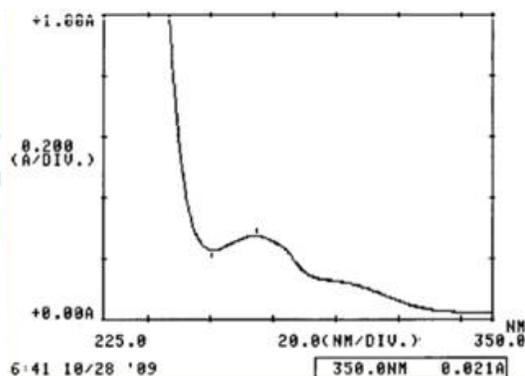


Figura 6: Muestra C01d6
Lectura: 274nm-0,277%abs
[Benzoilecgonina]: 107,82ppm

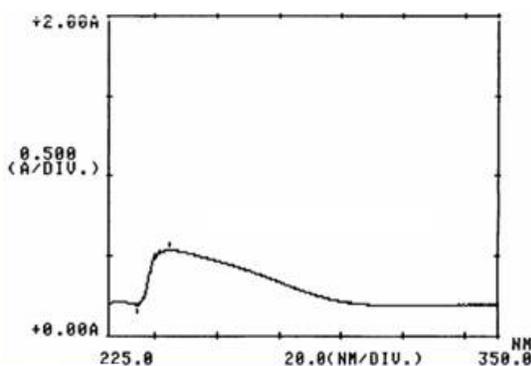


Figura 7 : Muestra X6.1
Lectura: 248,0nm-0,401%abs

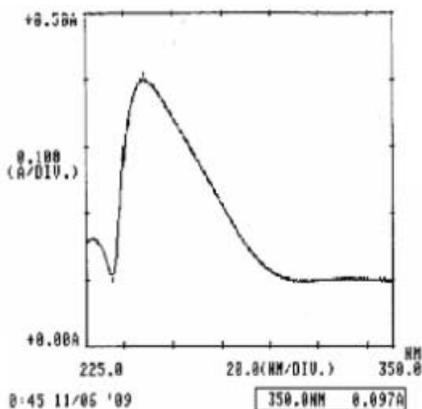


Figura 8 : Muestra X7.1-F
Lectura: 248,0nm-0,401%abs

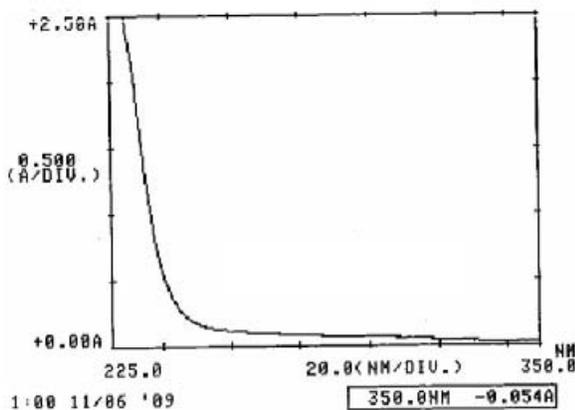


Figura 9 : B HNO₃
Lectura: 228,8nm-2,499%abs

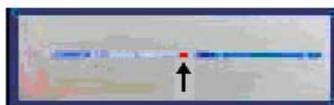
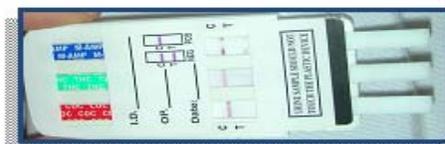


Figura 10: Test rapido

positivo en muestra C09
Lectura: Positivo: una línea roja (Control)
Negativo: dos líneas rojas

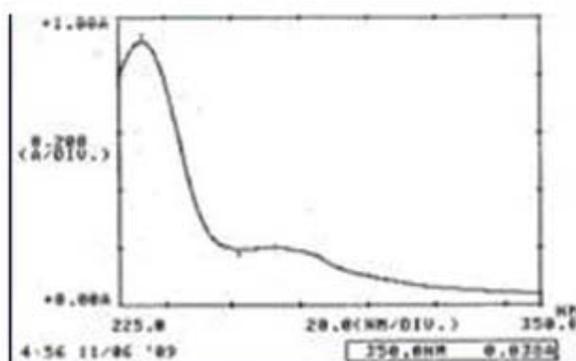


Figura 11: Espectro de muestra C09
Presencia de cocaína y benzoilecgonina
Lectura: Cocaína 232,4nm-0,917%abs

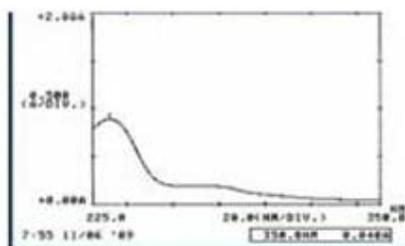


Figura 12 : Espectro de muestra C09
Segunda lectura
Lectura: Cocaína 232,4nm-0,898%abs
[Cocaína]: 20,865ppm

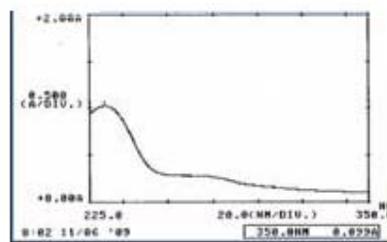


Figura 13 Espectro de control positivo
Lectura: Cocaína 233nm-1,024%abs
[Cocaína]: 23,808ppm

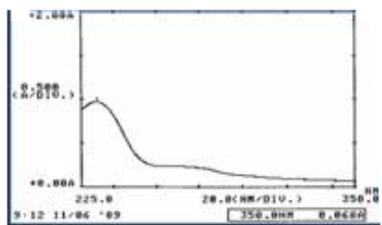


Figura 14 : Espectro de muestra C09 + Control positivo
Lectura: Cocaina 232,2nm-0,970%abs
[Cocaina]: 22,568ppm

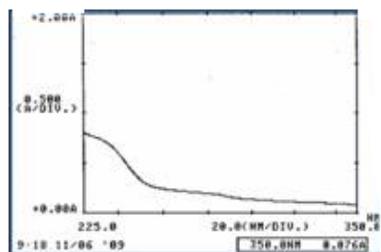


Figura 15: Espectro de control negativo
Lectura: No se observan picos de máxima absorbancia.

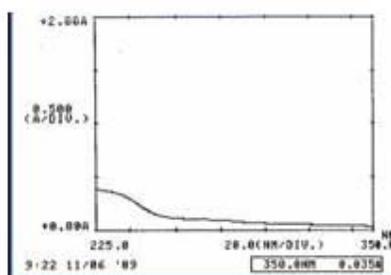


Figura 16 : Espectro de control negativo diluido.
Lectura: No se observan picos de máxima absorbancia

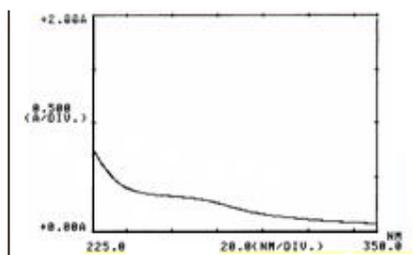


Figura 17 : Muestra 1.2 Lectura: HPA

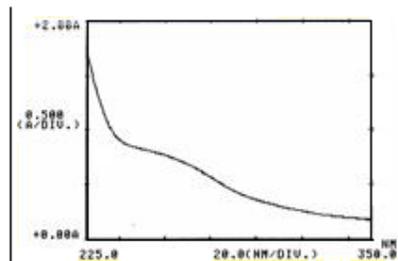


Figura 18: Muestra 1.3 Lectura: HPA

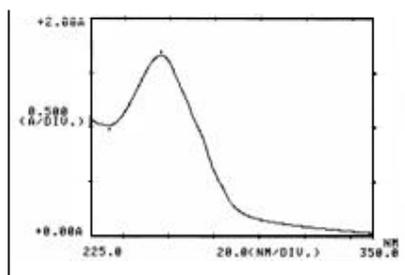


Figura 19: C03d1
Lectura: 256nm-1,662%abs

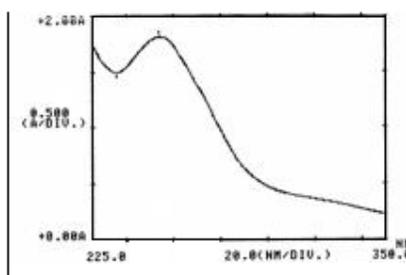


Figura 20: C03R
Lectura: 253nm-1,813%abs

Referencias Bibliográficas

1. Molina AC. Comparación entre diferentes métodos de extracción para la recuperación de cocaína previamente incorporada a una matriz sólida. *Cult.drog* 2007. 12 (14): 59-69.
2. Giannuzzi L, Ferrari LA, et al. Manual de técnicas analíticas en el laboratorio de toxicología y química forense. Buenos Aires: Praia; 2006.
3. Burguera M, Burguera JL. Microwave-assisted simple decomposition in flow analysis. *Anal Chim Acta*. 1998; 366: 63-80.
4. Great Smokies Diagnostic Laboratory (GSDL). Guía Profesional de Pruebas de Laboratorio. 2002
5. Hernández AF, Pla A, Villanueva E. Aplicación de los inmunoensayos EMITst y triage al análisis de opiáceos y cocaína en muestras de pelo. En: XI Jornadas Mediterráneas de Medicina Legal. España: Sociedad Española de Medicina Legal y Forense 1994. p. 104-106.
6. Hernández AF, Gil F, Pla A. Nuevas perspectivas en el análisis de drogas de abuso para el año 2000. *RECPC [revista en internet]* 1999; 1
7. Baumgartner A, Jones P, Baumgartner W, Black C. Radioimmunoassay of hair for determining opiate abuse histories. *J Nucl Med* 1979. 20: [748-752].
8. Pereira F, Yonamine M, Moraes R, Silva O. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2003 .798: [361-365].
9. Emmanuelle Cognard, Serge Rudaz, Stéphane Bouchonnet and Christian Staub. Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS *Journal of Chromatography B*. 2005. 826: [17-25].
10. Laura Mercolini, Roberto Mandrioli, Bruno Saladini, Matteo Conti, Cesare Baccini, Maria Augusta Raggi. Quantitative analysis of cocaine in human hair by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008. 73: [93-100].
11. Báez H, Camargo C, Guerrero E. Determinación de cocaína y sus metabolitos en pelos de consumidores. Determinación de niveles de corte. *Anales de la Universidad de Chile*. 2000; 5(11).

12. Moore C, Coulter C, Crompton K. Determination of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene and norcocaine in human hair using solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr B* .2007; 859: [208–212].
13. Fernández P, Lago M, Lorenzo RA, Carro AM, Bermejo AM, Tabernero MJ. Optimization of a rapid microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of opiates, cocaine and their metabolites in human hair. *J Chromatogr B* .2009; 877: [1743–1750].
14. Cognard E, Rudaz S, Bouchonnet S, Staub C. Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS. *J Chromatogr B [revista en internet]* 2005; 826: [17–25].
15. Gottardo R, Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Miksík I, Tagliaro F. Hair analysis for illicit drugs by using capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2007; 1159: [185–189].
16. Di Bernardo ML, García MY, Uzcateguá N, Procedimiento normalizado de trabajo: Determinación de cocaína. Mérida: Facultad de Farmacia Bioanálisis. Universidad de los Andes; 2008. Código 10-13.
17. Clarke's. Isolation and identification of drugs. 2ª ed. London: The pharmaceutical press; 1986.
18. Josh Gunn; Scott Kriger; Andrea R Terrell. Detection and quantification of cocaine and benzoylecgonine in meconium using solid phase extraction and UPLC/MS/MS. *J. Mol. Biol.* 2010. 603. [165–174].
19. Monika Janicka, Agata Kot-Wasik and Jacek Namieśnik. Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* . 2010. 29 [209-224].
20. Patrick S. Cardona, Arvind K. Chaturvedi, John W. Soper and Dennis V. Canfield. Simultaneous analyses of cocaine, cocaethylene, and their possible metabolic and pyrolytic products. [Forensic Science International](#). 2006. 147 [46-56].

Recibido: 21/06/10

Aceptado: 15/07/10