



**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS  
DERIVADAS DEL BAZUCO PRESENTES EN ORINA EN  
UNA POBLACIÓN DE CONSUMIDORES EN LA CIUDAD  
DE POPAYÁN USANDO CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE  
ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**

**WILMA MUÑOZ GÓMEZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2004**

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS DERIVADAS DEL  
BAZUCO PRESENTES EN ORINA EN UNA POBLACIÓN DE CONSUMIDORES  
EN LA CIUDAD DE POPAYÁN USANDO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE  
ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**

**WILMA MUÑOZ GÓMEZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Química**

**Director**

**M.Sc. JOSE ANTONIO GALLO C.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2004**

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

**Director**

---

**M.Sc. José Antonio Gallo Corredor**

**Jurado**

---

**M.Sc. Ricardo Benítez Benítez**

**Jurado**

---

**Qca. Tania Milena Gutiérrez**

**Fecha de sustentación: Popayán, 25 de Agosto de 2004**

Señor, Padre Nuestro, quiero darte gracias por el don de la vida. Por todo lo que tú has creado para nosotros tus hijos. Por el amor, la esperanza que le da sentido a nuestra vida y por la culminación de mi trabajo de grado.

Confío a ti el destino de mi vida porque tú eres la luz y el camino.

Gracias señor, por tu amor y tu lealtad.

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi gratitud de manera muy especial a:

Dios, por su amor y por darme el valor para luchar sin miedo.

José Antonio Gallo, profesor del departamento de química y director del trabajo de grado, por su orientación y colaboración durante la ejecución de este trabajo.

Víctor Campo Daza, profesor de la facultad de ciencias de la salud, por toda la ayuda suministrada y por sus importantes conocimientos compartidos.

Los profesores del departamento de química, por sus valiosas enseñanzas.

La Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca, por la financiación del trabajo de grado.

Rodrigo Andrés Sarria, por compartir sus conocimientos y por su magnífica colaboración.

Juan Pablo Delgado, por su compañía, apoyo y estímulo para salir adelante.

Carlos Julián Delgado, por su paciencia y cariño.

Mis compañeros y amigos, que de una u otra forma han permitido con sus ideas y su apoyo la culminación de este trabajo.

Mi madre y hermanas, por su amor y comprensión.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
2. OBJETIVOS	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. ANTECEDENTES	18
5. MARCO TEÓRICO	22
5.1 PLANTA DE COCA	22
5.2 COCAÍNA	23
5.3 BASE DE COCAÍNA O BAZUCO	25
5.3.1 Preparación	25
5.3.2 Composición	26
5.4 CINÉTICA DE LA COCAÍNA Y DEL BAZUCO	26
5.5 EFECTOS FÍSICOS Y PSICOLÓGICOS QUE PRODUCE EL CONSUMO DE BAZUCO	27
5.5.1 Efectos físicos	28
5.5.2 Efectos Psicológicos	28
5.6 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	30
5.6.1 Instrumentación para cromatografía de líquidos	30
5.6.2 Tipos de cromatografía	33
5.7 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	33
5.7.1 Elección de un método de extracción	34
5.7.2 Extracción a partir de muestras de orina	34
5.7.3 Extracción en fase sólida	36
6. METODOLOGÍA	37

6.1 MATERIALES Y EQUIPOS	37
6.2 REACTIVOS	37
6.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA	38
6.3.1 Preparación de las soluciones estándar	38
6.3.2 Técnica cromatográfica	38
6.3.2.1 Velocidad de flujo	38
6.3.2.2 Longitud de onda	39
6.3.2.3 Fase móvil	39
6.3.2.4 Tiempo muerto	39
6.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN	39
6.4.1 Dopaje de muestras	39
6.4.2 Técnica de extracción	40
6.5 TOMA, MANIPULACIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS	43
6.5.1 Zonas de estudio	43
6.5.2 Recipientes de muestreo	43
6.5.3 Muestreo	43
6.5.4 Preservación de muestras	43
6.6 ANÁLISIS POR HPLC	45
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la cocaína.	23
Tabla 2. Datos de velocidad de flujo vs AEPT para curva de Van Deemter.	47
Tabla 3. Datos de % ACN, y K.	51
Tabla 4. Parámetros cromatográficos óptimos para el análisis de cocaína.	52
Tabla 5. Tiempos de retención y % RSD de la cocaína.	55
Tabla 6. Datos para calcular límites de detección de la cocaína en HPLC.	57
Tabla 7. Límite de detección para cocaína.	57
Tabla 8. Límite de cuantificación para cocaína.	58
Tabla 9. Datos de las áreas y sus respectivas desviaciones estándar para la cocaína en un rango de concentraciones de 10 – 20 ppb.	59
Tabla 10. Datos de las áreas y sus respectivas desviaciones estándar para la cocaína en un rango de concentraciones de 20 – 100 ppb.	59
Tabla 11. Datos de las áreas y sus respectivas desviaciones estándar para la cocaína en un rango de concentraciones de 100 – 1000 ppb.	60
Tabla 12. Datos de las relaciones de áreas y desviaciones estándar.	61
Tabla 13. Datos de los porcentajes de recuperación de las áreas de la cocaína para la curva de 10 – 20 ppb.	62
Tabla 14. Datos de los porcentajes de recuperación de las áreas de la cocaína para la curva de 20 – 100 ppb.	62
Tabla 15. Datos de los porcentajes de recuperación de las áreas de la cocaína para la curva de 100 – 1000 ppb.	62
Tabla 16. Datos para evaluar la exactitud en el sistema de extracción.	63
Tabla 17. Datos de las muestras analizadas.	67

Tabla 18. Concentración promedio real de la cocaína en la orina.	68
Tabla 19. Datos de tiempos de retención de muestras y estándar de cocaína, y sus respectivas desviaciones estándar.	69

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Planta de coca.	22
Figura 2. Estructura química de la cocaína y sus principales metabolitos.	24
Figura 3. Esquema de un aparato de HPLC.	32
Figura 4. Montaje para extracción en fase sólida (SPE).	40
Figura 5. Ubicación de los puntos de muestreo (Mapa de Popayán).	44
Figura 6. Curva de Van Deemter para determinación del flujo óptimo.	47
Figura 7. Cromatograma de la cocaína a una $\lambda = 254$ nm.	49
Figura 8. Cromatograma de la cocaína a una $\lambda = 275$ nm.	50
Figura 9. Curva de variación de K con el % de ACN de la fase móvil.	51
Figura 10. Cromatograma de la cocaína a las condiciones óptimas de trabajo.	53
Figura 11. Curva de calibración de cocaína de 10 – 20 ppb.	55
Figura 12. Curva de calibración de cocaína de 20 – 100 ppb.	55
Figura 13. Curva de calibración de cocaína de 100 – 1000 ppb.	56
Figura 14. Cromatograma del blanco del cartucho y solventes utilizados en la SPE.	65
Figura 15. Cromatograma de una muestra de orina dopada.	66
Figura 16. Cromatograma de la muestra de orina N° 6.	71

## ABREVIATURAS

AC.AC: Ácido Acético

ACN: Acetonitrilo

AEPT: Altura equivalente del plato teórico

BE: Benzoilecgonina

C<sub>18</sub>: Fase estacionaria de 18 carbonos, octadecilsiloxano

COC: Cocaína

COCET: Cocaetileno

Detector UV: Detector Ultravioleta

EG: Ecgonina

ELL: Extracción Líquido - Líquido

EME: Ecgonina Metil Ester

GC/MS: Cromatografía de Gases acoplado a Masas

H<sub>2</sub>O: Agua

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

HPLC/MS: Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a Masas

IR: Infrarrojo

K: Factor de capacidad

L: Litros

LC: Cromatografía Líquida

ME: Metilecgonina

MeOH: Metanol

mg: Miligramos

N: Número de platos en la columna

nm: Nanómetros

NORCOC: Norcocaína

ppb: Partes por billón

ppm: Partes por millón

ppt: Partes por trillón  
S: Desviación estándar  
SPE: Extracción en fase sólida  
 $t_m$ : Tiempo muerto  
 $t_R$ : Tiempo de retención  
 $t_{obt}$ : Valor t obtenido  
 $t_{tab}$ : Valor t tabla  
UV: Ultravioleta  
 $\mu m$ : Micrómetros  
 $\mu L$ : Microlitros  
vs: Versus  
% RSD: Desviación estándar relativa  
 $\alpha$ : Factor de selectividad  
 $\bar{X}$ : Media de la muestra

## RESUMEN

Los altos costos que implica el consumo de cocaína pura, llevó a la producción de bazuco, producto de la transformación de las hojas de coca en cocaína cristalizada; aunque no se tiene un conocimiento pleno de los componentes del bazuco, se sabe que la sustancia esencial es la llamada base o pasta de coca.<sup>23</sup>

El bazuco al igual que la cocaína son alcaloides tóxicos, con una larga historia de uso y abuso. Su determinación, tanto en muestras no biológicas como en fluidos biológicos continúa siendo una tarea de primer orden.<sup>21</sup>

En el presente trabajo se reporta la estandarización del método de extracción de la cocaína cuyo metabolito principal es la benzoilecgonina (BE), a partir de muestras de orina, usando la técnica de extracción en fase sólida (SPE); con esta técnica se obtuvieron porcentajes de recuperación satisfactorios. También se estandarizó la técnica para determinar el contenido de cocaína en orina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección UV; se utilizó una columna empaquetada C<sub>8</sub> Octyl SGE de 5 µm de diámetro de partícula, 4mm de diámetro interno y 25 cm de longitud, detección ultravioleta (UV) a 254 nm, fase móvil agua-acetonitrilo-ácido acético (58-40-2) a un flujo de 0.4 mL/min. El límite de detección obtenido para la cocaína es de 0.088 ppb y el de cuantificación 0.295 ppb.

Para la aplicación del método se tomaron muestras de orina a 15 personas voluntarias que consumen bazuco en la ciudad de Popayán. En estas muestras se encontraron concentraciones de cocaína en un rango de 0.677 ppb a 1.795 ppb.

## INTRODUCCIÓN

Las drogas son todas aquellas sustancias naturales o sintéticas que introducidas en el organismo modifican, alteran, o reparan una de las funciones normales del organismo vivo.<sup>7</sup> Todos estos compuestos pueden ser determinados en matrices biológicas y no biológicas y de manera directa o indirecta.<sup>21</sup>

La detección de drogas en matrices biológicas resulta complicado debido a la complejidad de las muestras, por lo tanto para garantizar un buen análisis, se debe realizar un buen tratamiento de éstas.<sup>12</sup>

En esta investigación se realizó la estandarización de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para el análisis de cocaína en orina, optimizando las condiciones instrumentales, el tratamiento de la muestra, y evaluando el desempeño, validez y selectividad del método analítico escogido.

La matriz biológica tomada para la determinación de cocaína fue la orina, debido a que esta muestra constituye el fluido idóneo para este tipo de determinaciones, no solamente en el campo de la toxicología analítica y forense, sino también en el control antidopaje; además, las concentraciones de las drogas y sus metabolitos suelen estar entre 100 y 1000 veces mayores que en el suero.<sup>22</sup>

El estudio se llevó a cabo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, que es una técnica de laboratorio lo suficientemente sensible y específica, muy utilizada en la identificación de drogas, en lo que respecta fundamentalmente a fluidos biológicos. Algunas drogas como la morfina, cocaína y anfetaminas en general, han sido confirmadas por esta técnica.<sup>21-22</sup>

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La juventud actual, se enfrenta al fenómeno del uso de drogas como ninguna otra generación tuvo que hacerlo anteriormente. Esta creciente epidemia de drogadicción debe ser motivo de preocupación para todos los ciudadanos. El consumo de drogas tales como el bazuco, ocasiona daños de múltiples magnitudes y no solamente es un problema presente en Popayán y en Colombia, sino también de otros países del mundo, en donde hay gran demanda.<sup>10</sup>

Se conocen muy bien los efectos tóxicos del bazuco a nivel físico y del comportamiento tales como: excitación, disminución de peso, ansiedad, sudoración, alto riesgo de paro respiratorio y cardiaco, pérdida de la memoria, daño cerebral, deterioro irreversible de las neuronas, afecciones pulmonares, ceguera, infecciones del hígado y riñón. Además por ser la más adictiva, impura y peligrosa de las drogas debido al método rudimentario y sustancias tóxicas añadidas durante su proceso, tiene grandes repercusiones orgánicas, llevando al adicto a la muerte.<sup>3</sup>

Popayán se ha convertido en la segunda ciudad en consumo de bazuco en Colombia,<sup>38</sup> razón de gran preocupación para la sociedad en general, puesto que el fumar bazuco ocasiona problemas graves, para la salud de quienes lo consumen, para su adaptación social, laboral y afectiva. A raíz de este problema surgió la idea de determinar y cuantificar cocaína (componente activo del bazuco) en muestras de orina de consumidores de bazuco, con el fin de evaluar la toxicidad. Se escogió trabajar con este fluido biológico por ser una muestra idónea para la determinación de este tipo de drogas.

Por otro lado la detección de xenobióticos en matrices biológicas es una tarea difícil, debido a que la transformación parcial o total de los mismos en el organismo da lugar a la aparición de entidades químicas diferentes.<sup>21</sup> Por esto se hace necesario facilitar a los encargados de la investigación toxicológica en la Universidad del Cauca y en el

departamento del Cauca, el diseño de un protocolo para el aislamiento, determinación y cuantificación de estos componentes en orina. Este protocolo también podrá ser usado como un segundo análisis en pruebas para doping en deportistas cuyo análisis inmediato fue positivo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Implementar una metodología para la identificación y cuantificación del componente activo del bazuco (cocaína) en muestras de orina, utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección UV.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1** Contribuir con la estandarización de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección UV, para el análisis de cocaína en muestras biológicas.

**2.2.2** Diseñar un método para la extracción de cocaína presente en la orina, con el fin de preparar las muestras para el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución..

**2.2.3** Implementar un tratamiento preliminar de las muestras de orina, que permitan obtener resultados confiables.

**2.2.4** Proporcionar a la Universidad del Cauca un método analítico que pueda ser usado para el análisis de doping (cocaína), en deportistas.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en el campo de la investigación toxicológica, se hace necesario implementar nuevas herramientas que permitan dar solución eficaz a los diversos problemas que se presentan en este campo. De dicha necesidad surge el estudio de la determinación y cuantificación de cocaína en orina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución; como una nueva alternativa científica, que pueda ser utilizada para el beneficio de nuestra comunidad.

Cabe destacar que en el departamento del Cauca no se han realizado estudios de este tipo, lo cual se hace necesario debido a que Popayán presenta un alto índice de consumo de bazuco.<sup>38</sup> Este estudio es de gran ayuda, puesto que utilizando este método de análisis se puede monitorear el incremento o disminución de la población de consumo.

#### 4. ANTECEDENTES

La planta de coca fue clasificada por LEWIN<sup>10</sup> y es quizás la más típica y antigua de las sustancias llamadas erróneamente “narcóticos” en América, cuando la denominación correcta sería la de estupefacientes por ser sustancias que actúan sobre el sistema nervioso central, creando hábitos y dependencia.

Existen 16 especies americanas siendo la más importante la *Erytroxylon coca lamarck*, variedades que Hartiwich clasifica como: *Bolivianun burck*, *Spruceanum burck*, *Carhagenense*, *Novogranatense* y *Truxyllense*.<sup>10</sup>

La cocaína se extrae de la maceración de las hojas de la planta de la coca muy común en toda la región tropical de América del Sur. La frecuencia del uso de la cocaína se desconoce, pero su consumo ha aumentado considerablemente debido a grupos criminales que explotan este mercado.<sup>19</sup>

Los altos costos que implica el consumo de cocaína pura, llevaron a la producción del bazuco, como generalmente se conoce en los medios de comunicación.<sup>23</sup>

Aunque no se tiene un conocimiento pleno de los componentes de la mezcla utilizada con el nombre de bazuco o de bazuko, se sabe que la sustancia esencial es la llamada BASE O PASTA DE COCAÍNA. Esta base de coca es mezclada con una diversidad de sustancias que la hacen mucho más nociva: marihuana, acetona, amoníaco e incluso con solventes como gasolina y keroseno.<sup>23</sup>

La cocaína es administrada en humanos por vía oral, intravenosa e intranasal; esta es rápidamente metabolizada y excretada en la orina. El principal metabolito es la benzoilecgonina (BE) considerado como marcador del consumo de cocaína, no obstante, se han reportado adicionalmente otros 18 metabolitos en orina, de los cuales los más

importantes son la ecgonina metil ester (EME), ecgonina (EG), norcocaína (NORCOC) y cocaetileno (COCET), que se forma en presencia de etanol.<sup>6-22</sup>

La orina representa una muestra idónea para realizar una gran variedad de ensayos preliminares en la determinación de tóxicos. Las mayores ventajas de esta muestra son que la concentración de un tóxico en este fluido puede llegar a ser 100 veces mayor que en la sangre, y además, la orina esta exenta de proteínas por lo que las interferencias son menores. Una desventaja es que muchos tóxicos se eliminan prácticamente en su totalidad como metabolitos, que a veces son comunes a varias sustancias (benzodiazepinas, por ejemplo), porque en estos casos la identificación del tóxico requerirá el análisis de otro fluido o tejido. A pesar de todo, la orina sigue siendo la muestra de elección para la detección de drogas, ya que puede obtenerse fácilmente y en cantidades suficientes, y generalmente contienen concentraciones detectables de tóxicos.<sup>12</sup>

Para la determinación y cuantificación de la cocaína y sus metabolitos en orina se utiliza la técnica analítica Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), que es una técnica analítica de gran sensibilidad. Empleando esta técnica con diferentes sistemas de detección se han reportado muchos métodos para el análisis de drogas.<sup>21</sup>

Fernández, P. y Lafuente, N. emplearon la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa con detección ultravioleta, para la determinación de cocaína y su metabolito benzoilecgonina, en plasma y orina. Realizaron una extracción sólido - líquido utilizando cartuchos, y usaron metacuolona como compuesto de referencia; como fase móvil se usó metanol y buffer de fosfato (pH 7.0), en relación (70:30 v/v). La linealidad fue obtenida con un buen coeficiente de correlación. Se obtuvieron porcentajes de recuperación de 76.9 a 96.5 %, y coeficientes de variación siempre menores del 5.0 %. Encontraron que las muestras de orina de pacientes intoxicados con cocaína, contenían concentraciones de 0.21 - 75.55  $\mu$  g/mL de benzoilecgonina y menos de 4.16  $\mu$  g/mL de cocaína; mientras que en los análisis de orina de muertos encontraron concentraciones de

5.86 - 198.76  $\mu$  g/mL para benzoilecgonina y 2.56 - 33.24  $\mu$  g/mL para la cocaína. Finalmente, para muestras de sangre de muertos, fue todo negativo para cocaína y para benzoilecgonina se reportaron concentraciones de 0.040 - 0.53  $\mu$  g/mL.<sup>11</sup>

En el Instituto Nacional Tecnológico de Estándares (NIST) de Nueva York, Christensen, R. confirmó la presencia de cocaína y su metabolito principal benzoilecgonina en orina de humanos, por dos métodos independientes: Cromatografía de Gases acoplado a Masas (GC/MS); y por HPLC. El material estándar de referencia se trabajó con tres niveles de concentración para la cocaína y tres niveles para la benzoilecgonina. La metilecgonina, aunque este presente en el material, no se determinó. Con los dos métodos se obtuvieron buenos resultados, encontrando para la cocaína concentraciones de 90 – 263 ng/mL por GC/MS y 429 ng/mL por HPLC; y para la benzoilecgonina concentraciones de 103 – 259 ng/mL por GC/MS y 510 ng/mL por HPLC.<sup>6</sup>

Subas, C. y Jamdar, C. llevaron a cabo la estandarización de un método para la determinación simultánea de cocaína y sus metabolitos, benzoilecgonina (BE), norcocaína, y metilecgonina (ME), en orina y plasma de ratas. Realizaron una derivatización de la ME con p-fluorococaína, emplearon HPLC con dos columnas en serie (5  $\mu$  m Spheric C<sub>8</sub> y 5  $\mu$  m Cyanopropyl) y una fase móvil de Acetonitrilo/Agua/Acido Trifluoroacético grado HPLC en proporción (28:72:0.1 v/v); trabajaron además con Bupivacaina como estándar interno. Se determinó un límite de concentración de 25 ng/mL para cocaína, BE, y norcocaína y 50 ng/mL para ME usando 300 – 500  $\mu$  L de plasma de rata y 500  $\mu$  L de orina de rata. En los ensayos, la concentración fue lineal, de 2000 ng/mL para cocaína y sus metabolitos, en ambas muestras. Este método es aplicado a estudios Farmacocinéticos por sus buenos resultados.<sup>25</sup>

Por su parte Gurkeerat, S. y Vinod, A. desarrollaron un método para la cuantificación simultánea de cocaína y metabolitos como (metilecgonina, benzoilecgonina, y norcocaína) en plasma de ratas. El método se basa en el uso de un isótopo estable y dilución por

Cromatografía Líquida /Espectrometría de Masas (HPLC/MS). Las muestras de plasma no requieren de una limpieza para precipitar las proteínas, y tampoco se requiere de una derivatización. La curva estándar fue lineal dentro de un rango de 2 ng/mL a 1000 ng/mL para (benzoilecgonina, cocaína, norcocaína) y de 5 ng/mL a 1000 ng/mL para (metilecgonina). El límite de concentración más bajo para benzoilecgonina, cocaína y norcocaína fue de 2 ng/mL, y para metilecgonina fue de 5 ng/mL. El método permite un estudio detallado en farmacocinética.<sup>13</sup>

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 PLANTA DE COCA

Coca, nombre común de varios arbustos de América del Sur. Es una especie de particular importancia cuyas hojas utilizan los indios de Perú y Bolivia como estimulante. Las hojas secas, que contienen cocaína y otros derivados de ésta, se mezclan con óxido de calcio (cal viva), o con cenizas de madera y se mastican. En la figura 1 se observa un arbusto de coca, la cual puede alcanzar una altura aproximada de 1 a 2 m, con ramas rectas y hojas parecidas a las del té.<sup>34</sup>



**figura 1. Planta de coca.**

La coca pertenece a la familia *Erythroxylaceae*; y la especie cuyas hojas se usan como estimulante es la *Erythroxylum coca*.<sup>10</sup>

La coca es un arbusto de configuración piramidal, con flores blanco - amarillentas, de frutos rojos; posee hojas ovoides. Se cultiva en zonas de temperaturas entre 15 y 20 °C, en los bosques húmedos andinos.<sup>10</sup>

## 5.2 COCAÍNA

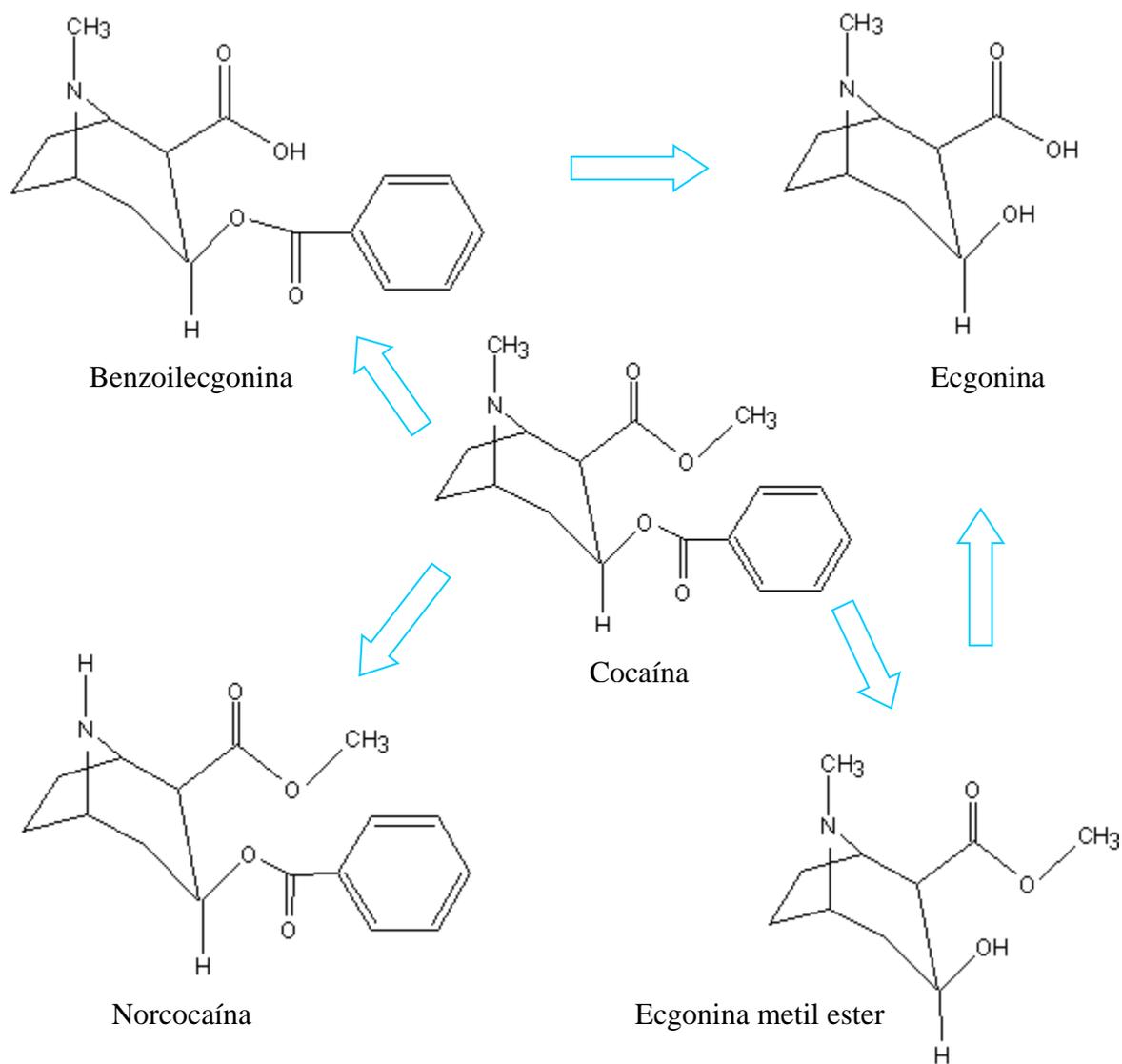
La cocaína es un alcaloide extraído de las hojas de la *Erythroxylon coca* o de sus diferentes variedades, o mediante síntesis a partir de la ecgonina o de sus derivados. Es una base amino alcohólica estrechamente relacionada con la tropina (amino - alcohol de la atropina) y tiene la estructura fundamental de los anestésicos locales sintéticos.<sup>10</sup>

Algunas de las propiedades fisicoquímicas de la cocaína se reportan en la tabla 1.<sup>18</sup>

**Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la cocaína ( Metil Benzoilecgonina).**

PROPIEDAD	DATO
Fórmula molecular	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>
Peso molecular	303.4 g/mol
Punto de fusión	189-196 °C
Densidad aparente	275 kg/m <sup>3</sup>
Absorción en UV	235-275 nm
Solubilidad	1 en 600 de agua 1 en 7 de etanol 1 en 0.5 de cloroformo 1 en 4 de éter

En la figura 2 se encuentra la estructura química de la cocaína y sus principales metabolitos.<sup>13</sup>



**Figura 2. Cocaína y sus principales metabolitos.**

De las hojas de coca se obtiene la pasta base (bazuco), de color marrón que es sulfato de cocaína y de esta, el clorhidrato de cocaína que es una sustancia blanca, en forma de cristalitas, hojuelas, o en polvo blanco, soluble en agua y de sabor amargo, se destruye por el calor. De esta a su vez se obtiene el crack, que es una forma de base libre mucho más purificada y con mayor poder de intoxicación y de adicción.<sup>35</sup>

### 5.3 BASE DE COCAÍNA O BAZUCO

El bazuco es un derivado de la pasta de coca, producido en el proceso de transformación de las hojas de coca en cocaína cristalizada.<sup>10</sup>

Es un polvo blanco - grisáceo o café de sabor amargo y olor picante; no se disuelve en agua, tiene un punto de fusión más elevado que el de la cocaína, es de más rápida absorción en el cuerpo y se emplea fumándolo.<sup>32</sup>

Debido a las impurezas del producto y las sustancias agregadas, el bazuco tiene un costo menor, esto ha hecho posible la invasión de éste a capas sociales menos favorecidas económicamente.<sup>10</sup>

**5.3.1 Preparación.** Para preparar la pasta base, basta con los siguientes precursores: petróleo o queroseno, ácido sulfúrico y un álcali que puede ser cal, carbonato sódico o potasa, ésta última es una variedad en bruto de carbonato potásico que se obtiene de las cenizas vegetales. Durante la primera fase, la salada, se mezclan las hojas con la potasa y se las deja reposar en un barril para que comiencen a disolverse los alcaloides. En la segunda, la mojadura, el queroseno se vierte sobre las hojas hasta empaparlas y se agrega un poco de ácido sulfúrico diluido para que ayude a descomponer las hojas. Esto permanece así durante 36 horas, al cabo de las cuales, los alcaloides flotan libremente en el queroseno que los absorbe. En la tercera fase, la prensa, se separa de las hojas todo el queroseno posible y mediante un sifón se trasvasa el queroseno a un barril y se desechan las hojas que han quedado negras y muertas. La penúltima fase, la guarapería, es la más delicada. Se agrega agua y ácido sulfúrico al queroseno y se deja reposar durante un día. El ácido penetra y separa los alcaloides que se disuelven en el agua. Al final, el queroseno está arriba y el guarapo abajo. Éste guarapo es una solución de cocaína y demás alcaloides a la que se le agrega más potasa o amoniaco para conseguir que éstos se precipiten. El guarapo adquiere entonces un color blanco lechoso y está listo para pasar a la última fase: la secadería, que consiste en filtrar el precipitado; para ello se utiliza una sábana y se deja secando al sol o

con focos hasta que adquiere la consistencia del barro húmedo. A partir de entonces está lista para venderse como pasta base para hacer cocaína o para dejarse secar por completo y venderse como bazuco. Químicamente es estable y puede transportarse en cualquier clima sin que pierda su potencia.<sup>39</sup>

**5.3.2 Composición.** El componente activo del bazuco es la cocaína, contiene entre 40 a un 85 % de sulfato de cocaína pura. Contiene además alcaloides psicoactivos de la coca, como ecgonina, benzoilecgonina, cinamilcocaína, higrina, metil cocaína, nicotina, cusco higrina, dihidroxitropano, trococaína y truxillina.<sup>14</sup>

Además contiene restos de los solventes utilizados en su preparación como gasolina, queroseno, ácido sulfúrico, éter, ácido benzoico, metanol, acetona, permanganato de potasio y cloroformo.<sup>32</sup> Anestésicos locales como: Procaína, lidocaína, tetracaína y benzocina. Azúcares como : lactosa, glucosa, inositol, maltosa y sucrosa. Mezclas callejeras como: polvo de ladrillo, talco, cerelac, bicarbonato, harina de trigo, maicena, marihuana, harina de pescad y escopolamina.<sup>29</sup>

Un cigarrillo contiene aproximadamente una concentración entre el 40 % y el 60 % de sulfato de cocaína.<sup>32</sup>

## **5.4 CINÉTICA DE LA COCAÍNA Y DEL BAZUCO**

La cocaína se absorbe muy bien y rápidamente por todos los sitios de aplicación, particularmente en presencia de edemas.<sup>10</sup>

La cocaína es absorbida por todas las mucosas y generalmente consumida intravenosa, intranasal, o fumando los vapores de la base libre (bazuco); cuando es inhalada, produce en pocos minutos niveles altos en plasma, el pico de acción ocurre a los 30 minutos y dura de 60 minutos a 4 - 6 horas. Fumado su acción se produce en 7 - 10 minutos y desaparece en 20 minutos. Su vida media en plasma es de 90 minutos. La vía intravenosa alcanza un pico

a los 5 minutos pero también se desaparece mucho más rápido. La forma oral tiene un pico de acción a los 60 minutos con una vida media que puede ser de horas, debido a la absorción continua. Debido a que la cocaína es una base débil, su absorción en el estómago es pobre, pero es rápida por el duodeno. Los efectos anestésicos locales comienzan en 1 minuto y duran 30 minutos a 1 hora. El pico plasmático oscila entre 0.06 a 0.41 mg/L dependiendo de la dosis y vías de administración. Es metabolizada rápidamente en el hígado por medio de las colinesterasas, la pseudocolinesterasa plasmática y por hidrólisis no enzimática, dando lugar a productos hidrosolubles como la benzoilecgonina y el metilester de ecgonina, una pequeña cantidad es metilada a norcocaína y tanto la cocaína en pequeña cantidad (del 1 % al 9 %), como sus metabolitos pueden identificarse en orina durante 48 - 72 horas. La utilización de alcohol y cocaína produce un metabolito activo, el cocaetileno, el cual tiene mayor vida media que la cocaína.<sup>35</sup>

Los niveles en casos fatales puede oscilar entre 0.1 a 20.9 mg/L, la muerte puede ocurrir con solo 20 mg de forma intravenosa, mientras que los habituales pueden ingerir por encima de 10 g/día sin reacción tóxica.<sup>10</sup>

Su eliminación se efectúa por vía renal con varios metabolitos de la ecgonina y con una pequeña cantidad de cocaína libre.<sup>32</sup>

Aunque la excreción de cocaína está aumentada con el pH urinario bajo, la excreción urinaria solo representa una fracción baja de la eliminación global y la acidificación terapéutica no tiene efectos significativos.<sup>35</sup>

## **5.5 EFECTOS FÍSICOS Y PSICOLÓGICOS QUE PRODUCEN EL CONSUMO DE BAZUCO**

En cuanto a los efectos, como con cualquier otro tipo de fármaco, estos no dependen únicamente del fármaco en sí, sino de la persona, del ambiente en que se consumen y de las expectativas que se tengan ante la droga.<sup>32</sup>

Al igual, dependen de muchas otras variables, tales como: bazuco “lavado” (Claro) o “bruto” (oscuro), de las dosis, de la frecuencia de consumo, las impurezas, los adulterantes y la motivación.<sup>23</sup>

Los efectos del bazuco se manifiestan casi de inmediato después de la primera inhalación del cigarrillo de bazuco, produciendo un efecto de euforia, los efectos duran entre cuatro a cinco minutos y después se produce una sensación de tristeza, de malestar que obliga a consumir más.<sup>32</sup>

**5.5.1 Efectos Físicos.** El consumo de esta sustancia conlleva a un elevado riesgo de muerte, altera el funcionamiento psíquico y predispone a la violencia y a la criminalidad, produce una pérdida de interés por todo lo que no tenga que ver con el bazuco, también fomenta la corrupción. Físicamente su deterioro es evidente, se presenta pérdida de peso, problemas en la piel, poca resistencia a las enfermedades, tos crónica, problemas intestinales, problemas hepáticos, también se presenta taquicardia, aumento de la presión arterial, sudoración, falta de apetito, ansiedad creciente, vómitos, insomnio, diarreas, ardor en los ojos, disminución de la atención, dificultades de tipo psicomotriz.<sup>32</sup>

**5.5.2 Efectos Psicológicos.** Los efectos psicológicos son claros, y se han dividido en cuatro fases a saber.<sup>32</sup>

- La primera fase es de euforia; se caracteriza por intenso placer, acompañado de labilidad afectiva, hipervigilancia, insomnio, hipersexualidad.
- La segunda fase es de disforia; este estado sobreviene después de pocas horas de fumar. Incluso tras el primer cigarrillo, con angustia intensa, afán desmedido de fumar; en algunas personas se observa tristeza, apatía agresividad y a partir de este estado hasta el último, hay indiferencia sexual.

- La tercera fase puede surgir sola o se continuidad de las otras; se caracteriza por alucinaciones visuales, cutáneas, auditivas y olfativas, con interpretaciones delirantes en muchos casos de tipo persecutorio; el paciente suele estar muy excitado y se encuentra preparado para huir o para agredir. Esta fase es pasajera, dura 2 o 3 días; desaparece gradualmente al dejar de fumar o al usar antipsicóticos.
- La cuarta es la fase de psicosis, aparece casi siempre luego de varios días de fumar bazuco y en ella hay una intensa agitación psicomotora con hipervigilancia e ideas de muerte, daño o persecución y con alucinaciones; en relación con el anterior estado, este es mas definido y prolongado, puede durar semanas o meses y responde bien a los neurolépticos.

Algunos de los signos que aparecen en las personas que consumen bazuco son:<sup>22</sup>

- Cambios de carácter, estados de animo que varían bruscamente sin causa justa.
- Desinterés por lo que lo rodea o por el trabajo, por los estudios.
- Problemas económicos que llevan al endeudamiento, al robo objetos primero del ámbito familiar y luego a compañeros de estudios o de trabajo.
- Problemas de adaptación social y familiar.
- Problemas conyugales.
- Busca el aislamiento.
- Perdida de memoria.
- Duerme poco.
- Modifica el lenguaje.

El uso ocasional de bazuco suele tornarse con prontitud en consumo problemático, puede confirmarse que la tolerancia se instaura rápidamente y que la adicción se presenta entre tres y seis meses de uso, si no es con mayor celeridad.<sup>32</sup>

## 5.6 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Es incuestionable que la Cromatografía Líquida de Alta Resolución es una de las técnicas de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son su especificidad, sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas.<sup>24</sup>

**5.6.1 Instrumentación para Cromatografía de Líquidos.** En la figura 3 se muestra un esquema de los componentes fundamentales de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución típico.<sup>24</sup> Los componentes son los siguientes:

◆ **Recipientes para la fase móvil y sistemas para el tratamiento de los disolventes.** Un aparato moderno de HPLC se equipa con uno o más recipientes de vidrio o de acero inoxidable, cada uno de los cuales contiene unos 500 mL de un disolvente. Los recipientes a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos. Con frecuencia estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión de los disolventes. Una separación que utiliza un solo disolvente de composición constante se denomina una elución isocrática. La elución con gradiente es aquella en la que se utilizan dos o más disolventes con una polaridad significativamente distinta. Una vez comienza la elución, se varía la relación de los disolventes de forma programada. Los instrumentos en la moderna HPLC a menudo están equipados con unos dispositivos que permiten introducir los disolventes desde dos o más recipientes en una cámara de mezcla a una velocidad que varía continuamente y la relación volumen de los disolventes se puede modificar lineal o exponencialmente con el tiempo.<sup>24-28</sup>

◆ **Sistemas de bombeo.** Los requisitos para un sistema de bombeo en HPLC son rigurosos e incluyen:

- La generación de presiones por encima de 6000 psi.
- Un flujo libre de pulsaciones.
- Un intervalo de caudales de 0.1 a 10 mL/min.
- El control y reproducibilidad del caudal mejor del 0.5 % relativo.
- Componentes resistentes a la corrosión.

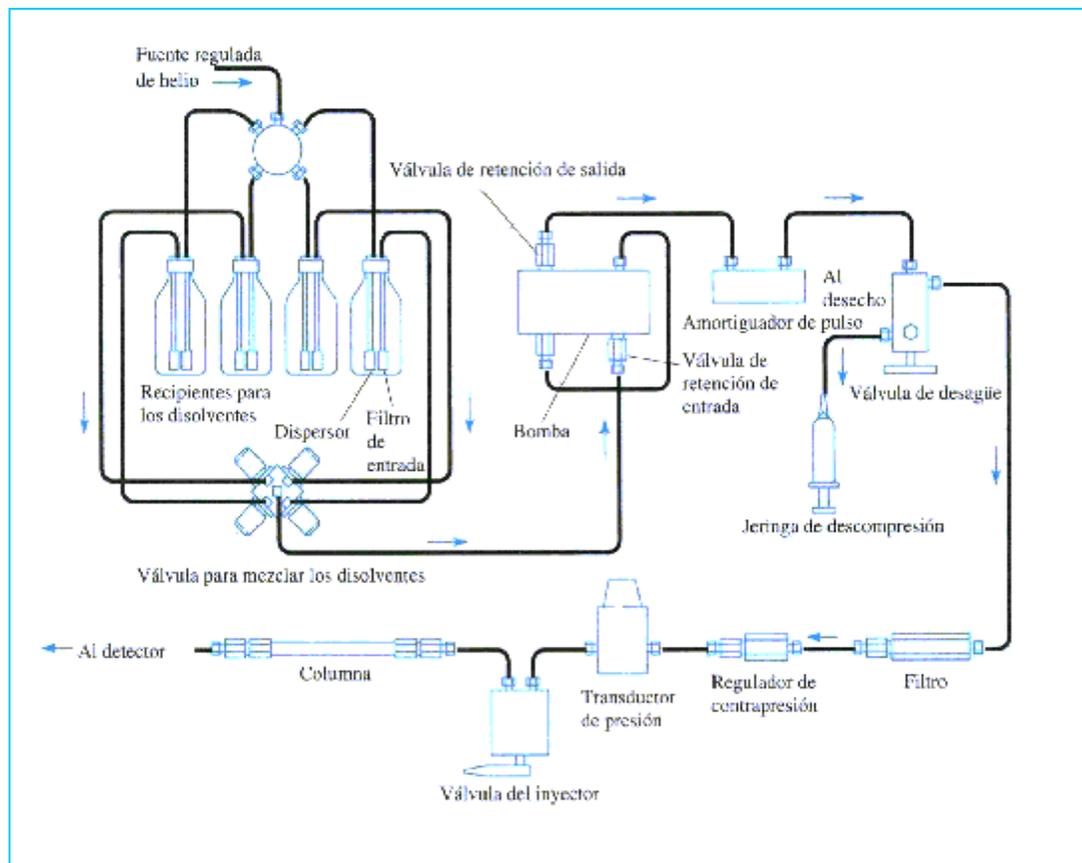
Se utilizan tres tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas recíprocas, bombas de jeringa o de desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante.

◆ **Sistemas de inyección de muestra.** A menudo, el factor limitante en la precisión de las medidas en Cromatografía de Líquidos es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. El problema se agrava por el ensanchamiento de banda que acompaña a la sobrecarga de las columnas. Por ello, los volúmenes que se emplean han de ser muy pequeños, de unas pocas décimas de microlitro a tal vez 500  $\mu\text{L}$ .

En Cromatografía de Líquidos el método más ampliamente utilizado para la introducción de la muestra utiliza bucles de muestra; estos dispositivos están normalmente integrados en el equipo cromatográfico.<sup>24</sup>

◆ **Columnas para Cromatografía de Líquidos.** Las columnas para Cromatografía de Líquidos se construyen generalmente con tubos de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, aunque en algunas ocasiones se encuentran tubos de vidrio de paredes resistentes. La mayoría de las columnas para Cromatografía de Líquidos tienen una longitud entre 10 y 30 cm. Por lo común, las columnas son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 y 10  $\mu\text{m}$ . Tal vez

la columna más frecuente utilizada es la de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, y empaquetada con partículas de 5  $\mu\text{m}$ . Estas columnas tienen de 40000 a 60000 platos/metro. En muchas ocasiones, para mantener la vida de la columna analítica, se coloca delante una precolumna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. La composición del relleno de la precolumna debe ser semejante al de la columna analítica.<sup>24-36</sup>



**Figura 3. Esquema de un aparato para HPLC.**

◆ **Detectores.** Los detectores en Cromatografía de Líquidos son de dos tipos básicos. Los detectores basados en una propiedad de la disolución responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. Por contraste, los detectores basados en una propiedad del soluto responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia UV, fluorescencia, o intensidad de difusión, que no son propias de la fase móvil.<sup>24</sup>

**5.6.2 Tipos de Cromatografía.** Existen cuatro tipos básicos de Cromatografía en los que la fase móvil es un líquido:<sup>36</sup>

- ◆ Cromatografía de reparto.
- ◆ Cromatografía de adsorción, o líquido-sólido.
- ◆ Cromatografía iónica.
- ◆ Cromatografía de exclusión por tamaños o en geles.

## **5.7 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**

Desde el punto de vista analítico, los tóxicos se pueden dividir en las siguientes categorías, atendiendo a los procedimientos necesarios para su extracción, que dependen de sus propiedades físico - químicas:

- ◆ Tóxicos gaseosos.
- ◆ Tóxicos volátiles.
- ◆ Tóxicos inorgánicos.
- ◆ Tóxicos orgánicos.

El principal problema es seleccionar un método eficiente para el aislamiento de los tóxicos orgánicos, que constituyen el grupo más numeroso.<sup>12</sup>

**5.7.1 Elección de un método de extracción.** A la hora de establecer un método de extracción, deben tenerse en cuenta los siguientes factores:

1. Requerimientos analíticos: detectar dosis letales, tóxicas o terapéuticas; detectar sólo el tóxico sin transformar o también sus metabolitos.
2. Tipo de muestra: en cuanto a cantidad y calidad.
3. Posibilidades del laboratorio: de instrumental y de personal.
4. Naturaleza del tóxico: conocida o desconocida; uno solo o una mezcla compleja; un producto bien conocido en cuanto a su analítica o un producto nuevo que necesite poner a punto un método adecuado para su extracción.

Cuando no se tiene información sobre el tóxico que puede contener una muestra biológica, ni siquiera si ese supuesto tóxico está presente, que es la situación más frecuente, hay que recurrir a métodos generales de extracción para conseguir separar de la forma más eficiente cualquier sustancia tóxica de la muestra.<sup>12</sup>

**5.7.2 Extracciones a partir de muestras de orina.** La orina es la muestra que con mayor frecuencia es enviada a los laboratorios clínicos y toxicológicos para realizar un rastreo de drogas de abuso, debido a que como regla general las concentraciones de las drogas y sus metabolitos suelen estar entre 100 a 1000 veces mayores que en el suero.<sup>12</sup>

En la literatura se han publicado muchos trabajos relacionados con el diagnóstico del consumo de cocaína, y uno de los aspectos cruciales es la metodología de aislamiento de la cocaína y sus metabolitos en muestras de orina.<sup>22</sup>

Sweeney W. y Cols. confirmaron la presencia de BE en muestras de orina mediante una extracción aplicando un método de “salting-out”. Para esto prepararon una mezcla de 5.0 g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y carbonato de potasio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) en relación (2:1), adicionándose a 10.0 mL de orina, para luego realizar la extracción con una mezcla de cloroformo : isopropanol (1.0:0.05). La capa orgánica fue reextraída con 4.0 mL de ácido

sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0.1 N y después de un paso de purificación, se registró el espectro UV (235 nm). De esta forma estos autores pudieron detectar concentraciones de BE del orden de 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .<sup>22</sup>

Por su parte Soriano C. y Cols. automatizaron el procesamiento de análisis de muestras de orina para la detección de más de 30 drogas de abuso, entre ellas la cocaína; adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de orina en un vial conteniendo 100 mg de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), colocándose dicho vial en un sistema robotizado, realizándose una extracción líquido-líquido con ter-butileter en medio alcalino con difenilamina como estándar interno. Se aspiró automáticamente la capa orgánica y se inyectó en el cromatógrafo. Fue reportado un recobro de 83.1 % para la COC con un límite de detección de 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .<sup>22</sup>

Sukbuntherng J. y Cols. combinaron una ELL con una SPE para extraer COC y sus metabolitos y en especial al COCET. Inicialmente estos autores realizaron una extracción con acetato de etilo en medio alcalino con tropocaina como estándar interno y posteriormente la capa acuosa resultante se aplicó en columnas ODS  $\text{C}_{18}$ , las cuales fueron previamente acondicionadas (3.0 mL de metanol, 3.0 mL de buffer carbonato pH 9.1), realizándose un lavado con una mezcla de 3.0 mL agua - metanol (80:20). La elución se realizó con 3.0 mL de metanol, de esta forma se reportó una recuperación superior al 91 % para la COC, COCET y la BE.<sup>22</sup>

Nishikawa M. y Cols. extrajeron simultáneamente COC, BE, EME, EG y NORCOC de muestras de orina con una combinación de dos columnas de SPE (BEC y Bond SCX). Primeramente aplicaron 1.0 mL de orina diluida con 1.0 mL de buffer fosfato en columnas BEC previamente activadas y después de los respectivos pasos de lavado y elución, el eluato resultante se diluyó con sendos mL de buffer fosfato y Etilendiaminotetraacetato de sodio ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) 0.1 %, aplicándose esta mezcla en la columna Bond SCX. La elución se efectuó en ambas columnas con metanol en amoniaco al 3 %, reportándose recobrados entre 40 y 95 %. Las determinaciones se realizaron por HPLC/MS.<sup>22</sup>

**5.7.3 Extracción en fase sólida.** La extracción en fase sólida es esencialmente una técnica de separación basada en los mismos principios de la Cromatografía Líquida, con un poder de resolución menor, pero con buena selectividad. La técnica de extracción en fase sólida es tal vez la más ampliamente utilizada hoy día en la preparación de muestras para análisis por Cromatografía Líquida, de Gases, Electroforesis y aún para Espectrofotometría.

En cualquier sistema de extracción en fase sólida se cuentan tres componentes a saber:

- 1) La muestra problema que contiene los analitos en una matriz compleja.
- 2) La fase estacionaria o soporte sólido (cartucho).
- 3) Los solventes de acondicionamiento, lavado y elución.

Los componentes de la muestra se separan por migración diferencial desde la fase estacionaria hacia los solventes de lavado y elución, atendiendo a las diferencias en cuanto a propiedades físicas o químicas, las cuales favorecen las fuerzas de retención para algunos compuestos y las fuerzas de elución para otros. La retención de los analitos en los cartuchos de extracción en fase sólida se realiza mediante diversos mecanismos. Los más corrientemente utilizados son: adsorción, partición en fase ligada normal y reversa, intercambio iónico, apareamiento iónico, complejación con iones metálicos, exclusión molecular y filtración en gel.<sup>15</sup> La SPE es una técnica muy utilizada para la extracción de cocaína y sus metabolitos en muestras biológicas.<sup>22</sup> Por lo cual se escogió para la extracción de cocaína en muestras de orina de consumidores de bazuco; para esto se utilizaron cartuchos C<sub>18</sub>, y se obtuvieron buenos porcentajes de recuperación.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 MATERIALES Y EQUIPOS

- Balanza analítica, XT 220A Precisa.
- Balones aforados SCHOTT de 10, 25, 50 y 100 mL.
- Cartuchos Supelco C<sub>18</sub> de 6.0 mL para extracción en fase sólida.
- Columna empaquetada C<sub>8</sub> Octyl, de 5 µm de diámetro de partícula, 4 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud; SGE (Scientific Glass Engineering).
- Controlador de vacío BUCHI B-721.
- Cromatógrafo Líquido Intralab. S,A, con detector UV modelo 5100.
- Deionizador de agua, electrónica y química, modelo D-1.
- Destilador de agua, Schott Gerate GMBH 8200.
- Distribuidor de vacío Visiprep DL-TM Supelco.
- Equipo de filtración al vacío Sigma-Aldrich de 1 L.
- Filtros Hewlett Packard de 0.45 µm Fisher Scientific.
- Jeringa Hewlett Packard de 10,0 µL para HPLC.
- Micropipetas de 100-200-500 µL
- Nevera, Haceb no frost.
- Papel Thermographic para integrador.
- pH-metro
- Sistema de vacío BUCHI B-169.
- Viales de 2 mL Supelco.

### 6.2 REACTIVOS

- Acetonitrilo, grado HPLC, J.T.Baker 100%.
- Ácido acético glacial, J.T.Baker 99.7%.

- Ácido clorhídrico 0.1N.
- Ácido sulfúrico 1N.
- Bazuco.
- Buffer de fosfato (pH 6).
- Cocaína estándar.
- Diclorometano, grado HPLC
- Isopropanol, grado HPLC
- Metanol, grado HPLC, Mallinckrodt 99.9%.

### **6.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA**

**6.3.1 Preparación de las soluciones estándar.** Se preparó una solución estándar de referencia de 40 ppm a partir de 4.0 mg de cocaína, la cual se diluyó en 0.5 mL de ácido sulfúrico y se aforo con una mezcla de acetonitrilo - agua - ácido acético (40:58:2), en un matraz de 100 mL. A partir de esta solución se preparó por dilución una de 10 ppm, solución a partir de la cual se prepararon las soluciones estándar de trabajo con el fin de llevar a cabo el análisis cromatográfico. Las soluciones se prepararon basándose en los límites de detección y cuantificación y a las investigaciones hechas con la cocaína, las cuales muestran valores críticos y valores tolerables para determinar el rango de concentraciones.<sup>13</sup>

**6.3.2 Técnica cromatográfica.** Se fijan los parámetros óptimos de trabajo con el equipo tales como: velocidad de flujo, longitud de onda en el detector UV, fase móvil, tiempo muerto.

**6.3.2.1 Velocidad de flujo.** Para determinar la velocidad de flujo con la que se va a trabajar, se preparó una solución de 0.1 ppm de cocaína y se inyectó en el cromatógrafo, variando la velocidad de flujo de la fase móvil desde 0.2 hasta 2.5 mL/min; estas inyecciones se realizaron por triplicado y las condiciones cromatográficas fueron: fase móvil acetonitrilo - agua - ácido acético (40:58:2), longitud de onda 254 nm. Con estos

flujos y su correspondiente AEPT, se construyó la curva de Van Deemter para escoger la velocidad de flujo óptima.

**6.3.2.2 Longitud de onda.** Se trabajó con el detector ultravioleta a 3 longitudes de onda (235, 254 y 275 nm) para poder realizar una comparación de señales cromatográficas y así seleccionar la longitud de onda de trabajo; las longitudes de onda se tomaron basándose en un barrido espectrofotométrico que se realizó al estándar de cocaína. Se trabajó con las mismas condiciones cromatográficas, inyectando un patrón de 0.1 ppm de cocaína.

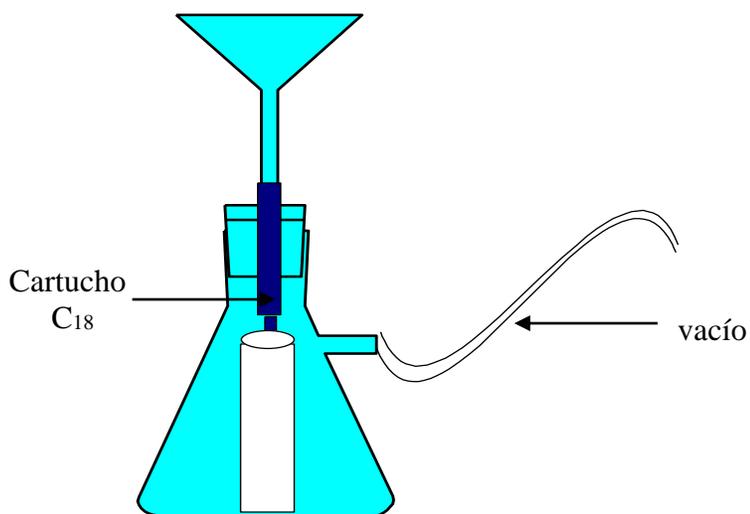
**6.3.2.3 Fase móvil.** Para la escogencia de la fase móvil se inyectó una solución de 0.1 ppm de cocaína a las mismas condiciones cromatográficas, pero realizando diferentes proporciones de la fase móvil (ACN - H<sub>2</sub>O - AC.ACT); para cada proporción se inyecta por triplicado la cocaína.

**6.3.2.4 Tiempo muerto.** Se preparó una solución de 1.0 ppm de dicromato de potasio y se inyectó en el cromatógrafo bajo las mismas condiciones cromatográficas. El tiempo que le tomaría al soluto atravesar desde el inyector al detector sin participar en ningún proceso de retención, es el tiempo muerto.

## **6.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN**

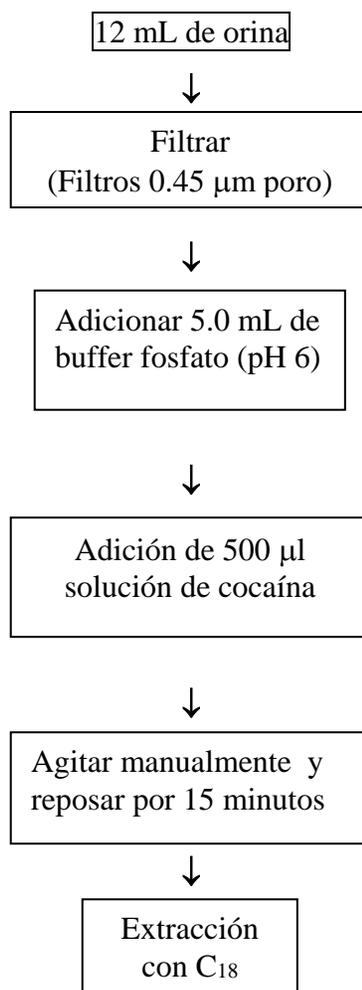
**6.4.1 Dopaje de muestras.** Se tomaron 12.0 mL de orina de personas no consumidoras de bazuco, se le adicionaron 5.0 mL de buffer de fosfato (pH 6) y 50 µL de una solución de cocaína de 20 ppb; se agitó y reposó por 15 minutos; se filtraron las muestras con filtros de 0.45 µm de poro y se procedió a realizar la extracción y luego la cuantificación. Se realizaron igualmente otros ensayos por triplicado, pero adicionando la cocaína en otras concentraciones conocidas.

**6.4.2 Técnica de extracción.** Se empleó el proceso de extracción en fase sólida SPE para la cual se organizó un montaje que consta de un equipo de filtración y una bomba de vacío (ver figura 4). Se utilizaron cartuchos  $C_{18}$ , los cuales se acondicionaron agregando sucesivamente 3.0 mL de metanol, 3.0 mL de agua desionizada y 1.0 mL de buffer de fosfato (pH 6). Luego el cartucho es cargado con 12.0 mL de la muestra y se aplicó vacío, con un goteo de 2 a 3 mL por minuto. Posteriormente se lleva a cabo el lavado de la columna con 1.0 mL buffer de fosfato (pH 6) – 2.0 mL agua desionizada – 2.0 mL ácido clorhídrico 0.1 N y 3.0 mL de metanol, se deja secar el adsorbente por acción de vacío durante 10 minutos. El paso siguiente es realizar la elución agregando 10.0 mL de una mezcla de diclorometano - isopropanol/acetonitrilo (80:20/100), siendo concentrado el extracto obtenido hasta sequedad en baño maria a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  y burbujando sobre la solución nitrógeno. Finalmente se afora a  $500\text{ }\mu\text{L}$  con la fase móvil de trabajo (ACN -  $\text{H}_2\text{O}$  - AC:ACT) para luego realizar el análisis por HPLC, con el fin de obtener el porcentaje de recuperación del método de extracción para la cocaína.

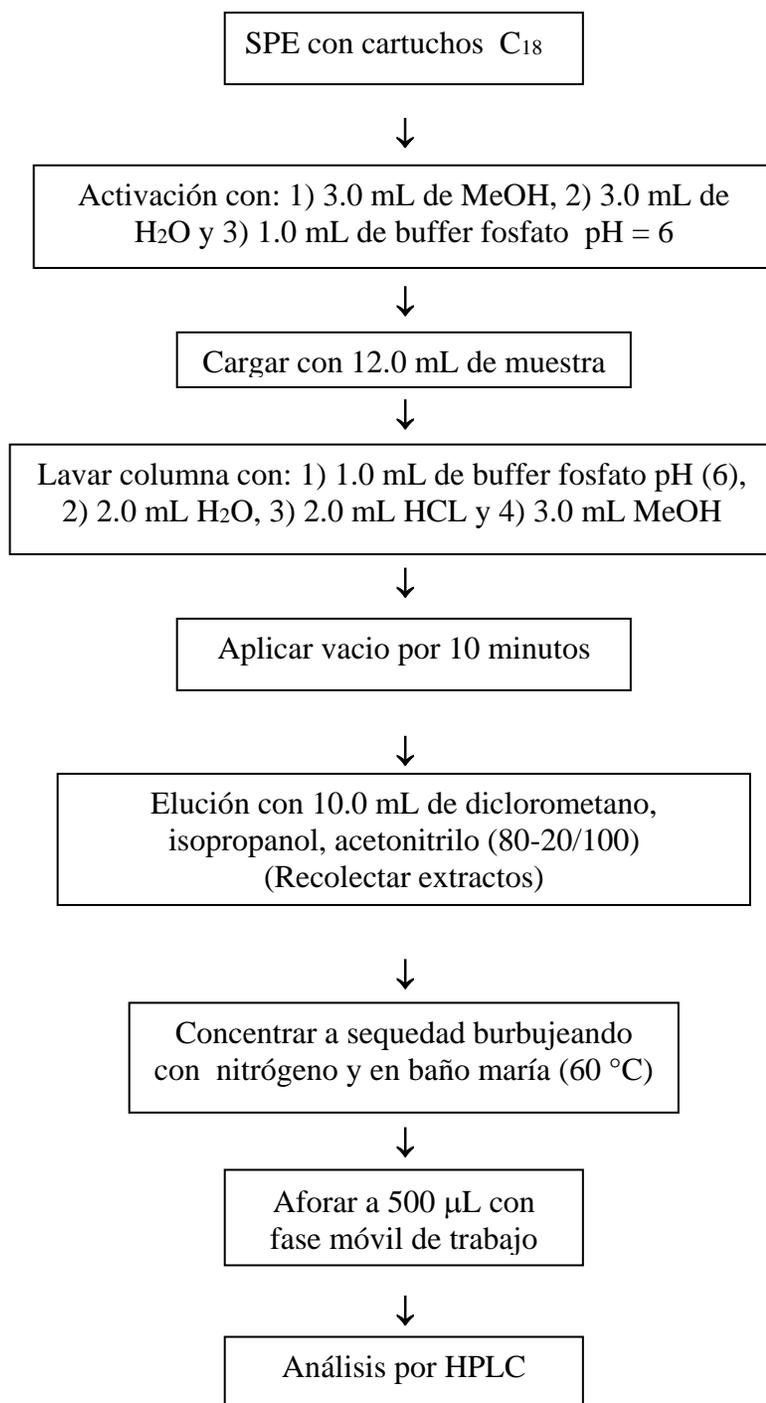


**Figura 4. Montaje para extracción de cocaína**

Este proceso se realizó para las muestras dopadas y para las muestras de orina de consumidores. La escogencia de esta metodología se basó en las pruebas realizadas teniendo como base las diferentes referencias bibliográficas.<sup>22</sup>



**Diagrama 1. Dopaje de muestras**



**Diagrama 2. Técnica de extracción de cocaína en muestras de orina**

## **6.5 TOMA, MANIPULACIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS**

Con el fin de cumplir con los objetivos propuestos en este trabajo, se realizaron muestreos en los cuales se pudiera verificar su validez y aplicabilidad en muestras de orina (matriz real), de personas expuestas al consumo de bazuco.

**6.5.1 Zonas de estudio.** Fueron escogidas según referencias que se tenían de estos sitios.<sup>38</sup> Se realizó el muestreo en los barrios: Los Sauces, Alfonso López y Treinta y uno de Marzo, los cuales están ubicados dentro del Municipio de Popayán, en las comunas 5, 6 y 7 respectivamente como se observa en la figura 5.

**6.5.2 Recipientes de muestreo.** Las muestras se recogieron en recipientes plásticos de 30 mL, especiales para muestras de orina; se tuvo en cuenta que los recipientes estuvieran perfectamente limpios, desinfectados, secos y que se pudieran cerrar herméticamente ya que por ser una muestra biológica es de especial cuidado.

**6.5.3 Muestreo.** Debido al difícil acercamiento a las personas consumidoras de bazuco, por su conducta, agresividad, deterioro físico y psicológico; se realizó un solo muestreo a 15 personas voluntarias, para así poder aplicar el método. Estas personas se encuentran repartidas en las zonas escogidas. La cantidad de orina recolectada a cada persona fue de 30 a 35 mL aproximadamente, suficiente para la confirmación y cuantificación del tóxico.<sup>22</sup>

**6.5.4 Preservación de muestras.** Las muestras recolectadas, no necesitan de ningún conservante, pero si es importante mantenerlas en frío a 4°C. Tanto la cocaína en pequeña cantidad (del 1 % al 9 %) como sus metabolitos (BE, EG, EME, NORCOC), pueden identificarse en orina durante 48 - 72 horas, según reportes bibliográficos.<sup>13</sup>

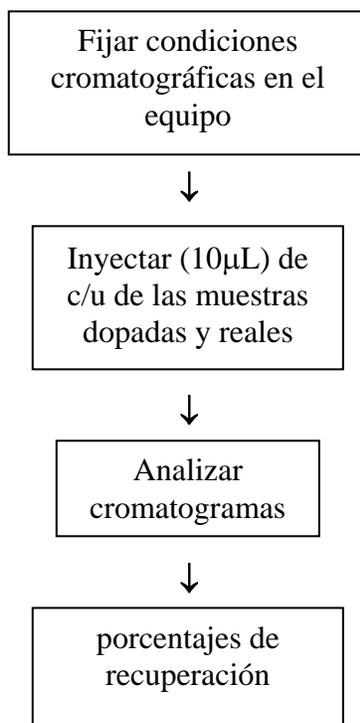


- 5 Comuna 5: Barrio Los Sauces
- 6 Comuna 6: Barrio Alfonso López
- 7 Comuna 7: Barrio Treinta y uno de Marzo

**Figura 5. Ubicación de los puntos de muestreo (Mapa Popayán)**

## 6.6 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Una vez optimizados los parámetros cromatográficos de análisis y de extracción de las muestras, se procede a realizar la confirmación de la presencia o ausencia de la cocaína en orina y realizar su cuantificación; para ello se fijan las condiciones de trabajo mediante la técnica cromatográfica HPLC.



**Diagrama 3. Análisis de cocaína por HPLC**

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Para trabajar con las muestras biológicas reales, es necesario haber establecido primero los parámetros cromatográficos óptimos de la técnica analítica.

#### 7.1.1 Técnica cromatográfica

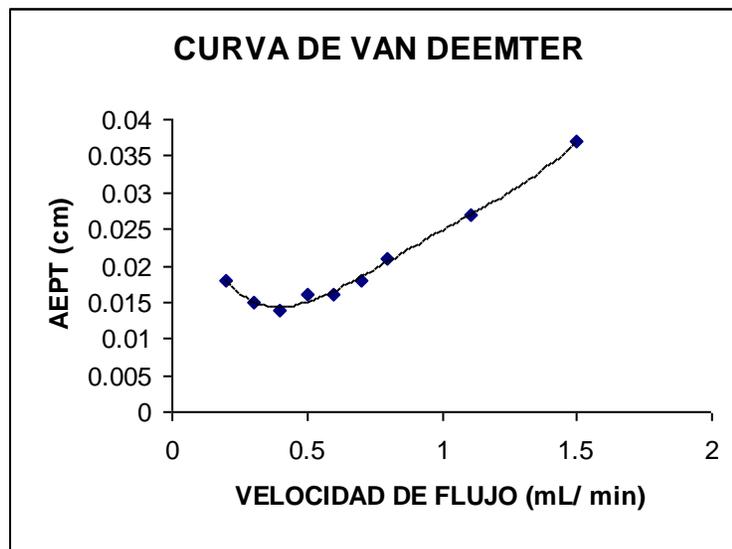
**7.1.1.1 Selección de la columna.** Es importante elegir la columna adecuada para llevar a cabo el estudio, ya que dependiendo de la fase estacionaria, la cocaína será retenida de manera efectiva. A iguales condiciones se ensayaron dos columnas, usadas anteriormente en otro tipo de análisis, la SGE C<sub>8</sub> (Octyl) 250 x 4 mm ID y 5 µm de tamaño de partícula y la C<sub>10</sub> (Decyl) 250 x 4.6 mm ID y 5 µm de tamaño de partícula. Con la columna C<sub>8</sub> (Octyl) se obtuvo una buena resolución, resultó ser apta para el análisis de cocaína debido a que presenta afinidad del compuesto con la fase de la columna, lo cual hace que la cocaína sea retenida de forma efectiva. La afinidad del compuesto con la fase móvil es debida a la presencia de grupos ester en la cocaína.

Aunque la diferencia entre las columnas C<sub>8</sub> y C<sub>10</sub>, no debería ser tan apreciable, con la columna C<sub>10</sub> no hubo buena resolución, a pesar de ser de cadena más larga y originar un relleno que muestra una mayor retención; este resultado es atribuido al mal uso que pudo haber tenido la columna analítica en anteriores análisis, en donde pudo haber perdido su homogeneidad.

**7.1.1.2 Determinación del flujo óptimo.** Para seleccionar el flujo de la fase móvil adecuado, se realizó la curva de Van Deemter con los datos reportados en la tabla 2. Y se grafica el flujo en mL/min vs AEPT en cm (altura equivalente del plato teórico), como se observa en la figura 6.

**Tabla 2. Datos de velocidad de flujo vs AEPT para curva de Van Deemter**

<b>Flujo (mL/min)</b>	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	1.0	1.5	2.5
<b>AEPT (cm)</b>	0.018	0.015	0.014	0.016	0.016	0.018	0.021	0.027	0.037	0.048



**Figura 6. Curva de Van Deemter para determinación de flujo óptimo**

De dicha gráfica, puede observarse que el flujo de trabajo se encuentra en 0.4 mL/min, donde la curva presenta la menor altura equivalente del plato teórico (0.014 cm), conduciendo así a un aumento del número de platos teóricos que es el ideal a la hora de determinar el flujo para la columna escogida (Octyl 250 x 4 mm ID y 5  $\mu$ m de tamaño de partícula).

Determinar la velocidad de flujo en el análisis es de gran importancia, puesto que la magnitud de los efectos cinéticos sobre la eficacia de la columna dependen claramente del tiempo de contacto entre la fase móvil y la fase estacionaria, que depende del caudal de la fase móvil.

Se pudo observar que a flujos menores, el análisis se hace más largo, lo cual no es eficiente, además que provoca ensanchamiento en las señales; y a flujos mayores, se presentó pérdida de resolución.

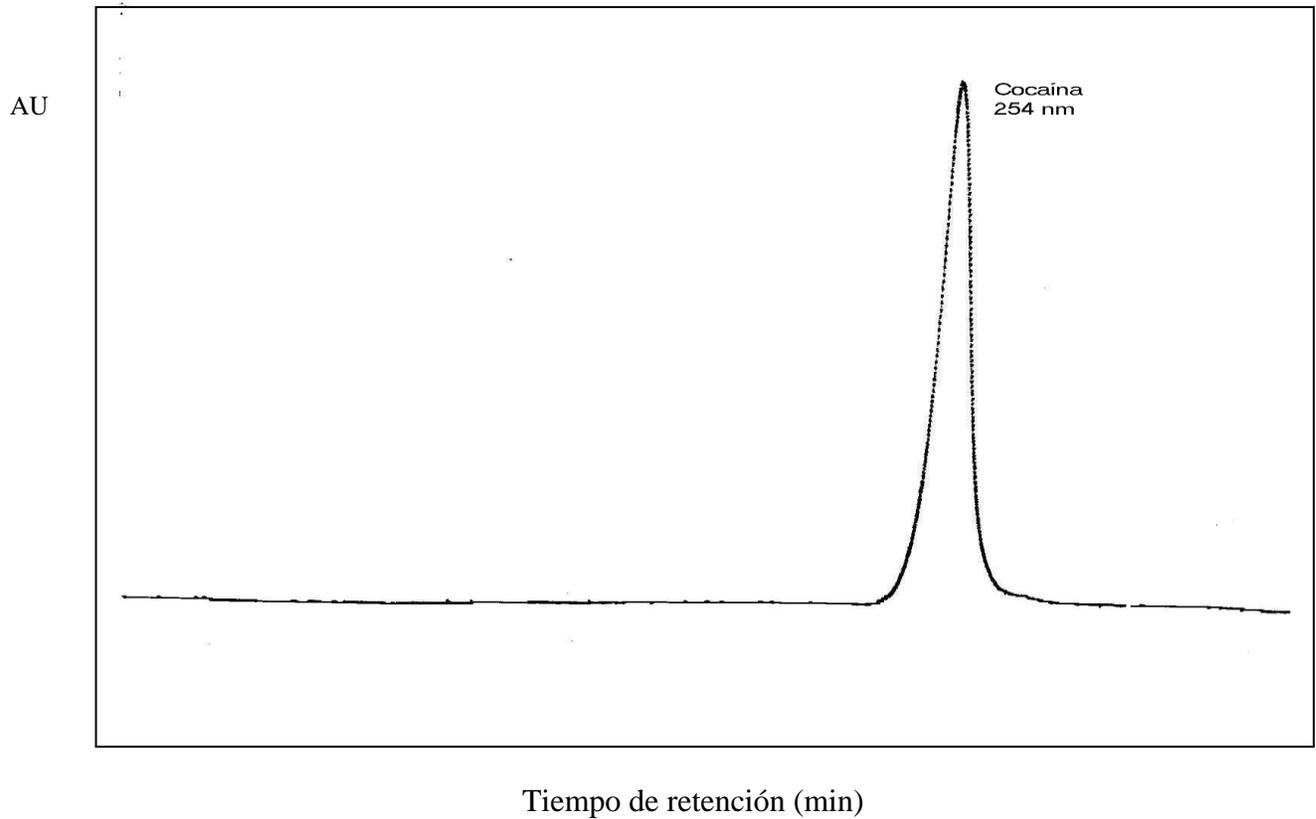
El número de platos teóricos calculado para la columna C<sub>8</sub> fue de 1786 platos, lo cual indica que la columna está en buenas condiciones frente al analito, además, la eficacia del sistema cromatográfico depende del número de platos teóricos.

**7.1.1.3 Longitud de onda de trabajo.** Con el fin de obtener una buena intensidad de señal con el detector UV, se trabajó con 3 longitudes de onda diferentes (235 - 254 y 275 nm), para poder así realizar una comparación de cada señal y seleccionar la longitud de onda apropiada en este detector para la determinación de cocaína; estas longitudes de onda se seleccionaron en base a un barrido espectrofotométrico realizado a la cocaína.

A 235 nm el detector tardó en estabilizar entre 10 y 12 horas aproximadamente, por lo cual se decidió no trabajar con esta longitud de onda, ya que por el gasto de solventes el análisis resulta muy costoso; además hay que tener en cuenta que en un análisis cromatográfico también se busca realizar el análisis en el menor tiempo posible y que a la vez resulte económico. A las otras dos longitudes de onda, el detector estabilizó aproximadamente a las 3 horas.

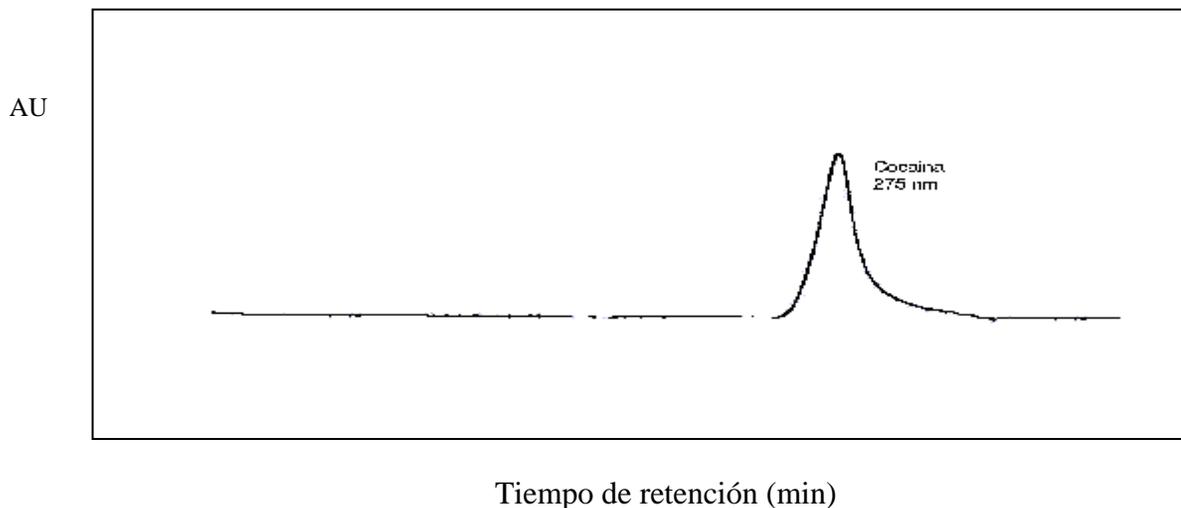
Las figuras 7 y 8 muestran las señales cromatográficas de la cocaína a longitudes de onda de 254 y 275 nm. En estas gráficas se puede observar que la que presenta el pico mejor resuelto es la registrada a 254 nm, donde se puede apreciar que la señal es grande y muy bien definida puesto que a esta longitud de onda, la cocaína presenta el máximo de

absorción. Además, con esta longitud de onda se obtuvieron bajos límites de detección y cuantificación.



PICO	AREA %	TR	AREA
1	100	4.06	2880380
TOTAL	100		2880380

**Figura 7. Cromatograma de la cocaína a una  $\lambda=254$  nm**



PICO	AREA %	TR	AREA
1	100	4.02	2447453
TOTAL	100		2447453

**Figura 8. Cromatograma de la cocaína a una  $\lambda=275$  nm**

Por otro lado, si se realiza una comparación de áreas, puesto que estas son al igual que la altura de los picos, un parámetro analítico adecuado para analizar cromatogramas,<sup>24</sup> se observa que el pico de la cocaína a 254 nm presenta una mayor área igual a 2880380 y el pico a 275 nm muestra una área menor de 2447453; demostrándose así con esta comparación que la longitud de onda de 254 nm, resulto ser la óptima para el análisis de cocaína.

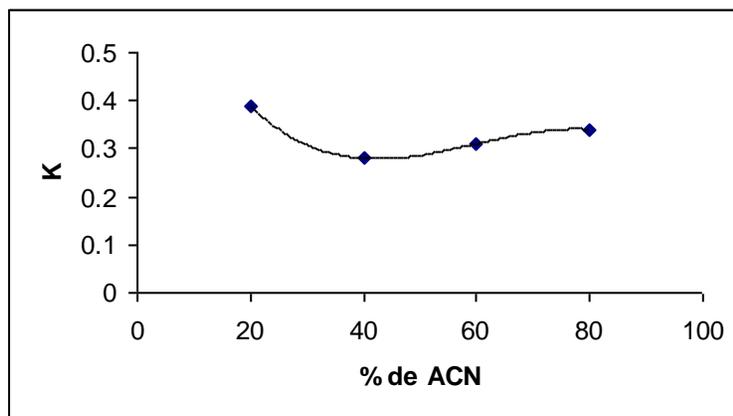
**7.1.1.4 Fase móvil óptima.** Con la variación de la fase móvil (80 % - 20 % de cetonitrilo), se calculó el factor de capacidad (K), que se define como la relación entre el tiempo de retención ( $t_R$ ) y el tiempo muerto ( $t_M$ ); y esta relacionado con la velocidad de migración del analito en la columna.

El tiempo muerto calculado con las soluciones de dicromato de potasio fue de 3.21 min.

En la tabla 3 se reporta el factor de capacidad K, de acuerdo al porcentaje de acetonitrilo de la fase móvil; con estos datos se realiza la curva de variación de K con el porcentaje de acetonitrilo de la fase móvil, como se observa en la figura 9.

**Tabla 3. Datos de % de ACN y K**

% ACN	20	40	60	80
K	0.39	0.28	0.31	0.34



**Figura 9. Curva de variación de K con el % de ACN de la fase móvil.**

De acuerdo con la figura anterior, el mejor porcentaje de acetonitrilo para la elución isocrática para la cocaína es del 40 %, donde el factor de capacidad  $K$  es de 0.28.

El factor de capacidad es un parámetro importante que con frecuencia se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas. Idealmente, las separaciones se realizan en unas condiciones en las que los factores de capacidad para las especies de una mezcla oscilan entre 1 y 5.<sup>24</sup>

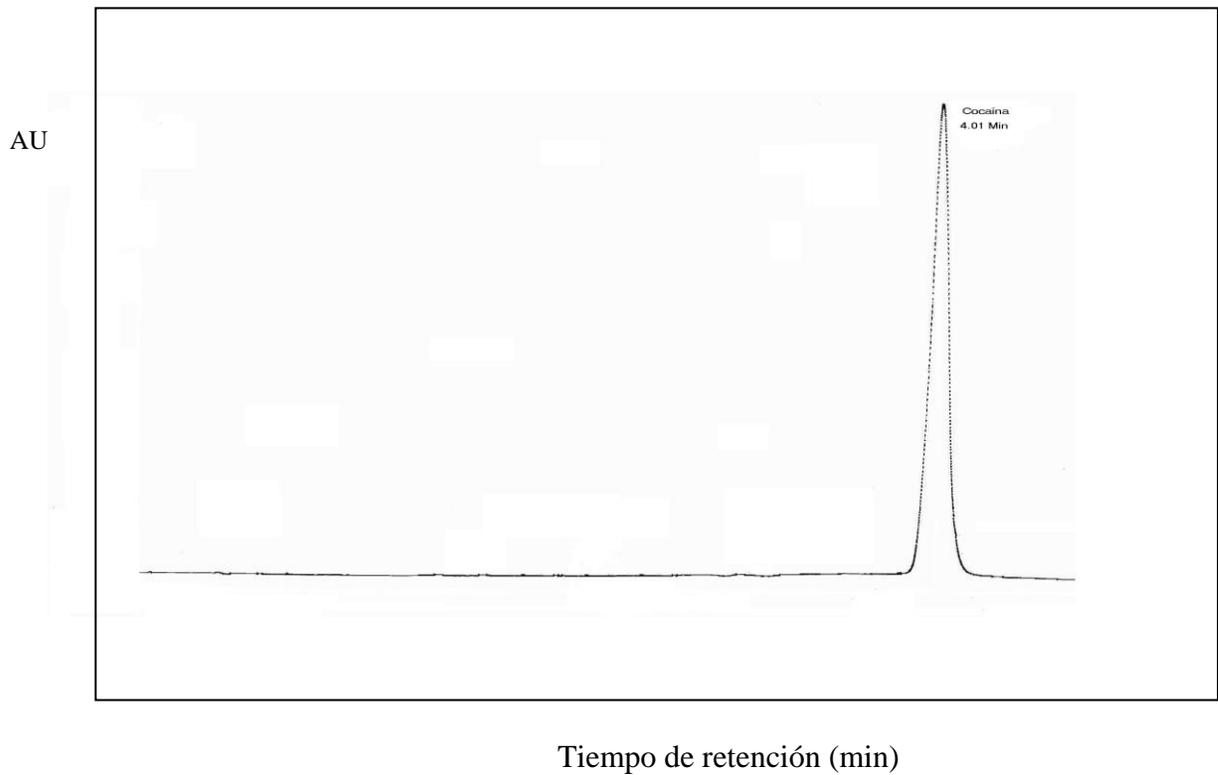
Debido a que el tiempo de retención de la cocaína no es muy largo, se obtuvo un factor de capacidad de 0.28, y a pesar de ser menor que la unidad, se obtuvo una buena resolución.

**Condiciones óptimas de trabajo para el HPLC.** En la tabla 4 se reportan las mejores condiciones para el análisis de cocaína por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

**Tabla 4. Parámetros cromatográficas óptimas para el análisis de cocaína.**

PARÁMETRO	CONDICIÓN
Columna	SGE C <sub>8</sub> (Octyl) 250 x 4 mm ID y 5 μm de tamaño de partícula
Flujo de la fase móvil	0.4 mL/min
Longitud de onda con detector UV	$\lambda = 254$ nm
Fase móvil	ACN –H <sub>2</sub> O –AC.ACT (40:58:2)
Volumen de inyección	10 μL

Bajo estas condiciones cromatográficas, se inyectó una muestra patrón de cocaína de 1.0 ppm, cuyo cromatograma se observa en la figura 10, en este cromatograma se puede apreciar la buena resolución del pico y un tiempo relativamente corto de análisis.



PICO	AREA %	TR	AREA
1	100	4.01	2782919
TOTAL	100		2782919

**Figura 10. Cromatograma de la cocaína a las condiciones óptimas de trabajo.**

Con el fin de determinar la repetitividad del tiempo de retención de la cocaína, se llevó a cabo la inyección de la cocaína a 1.0 ppm; se inyectó 10 veces a las condiciones cromatográficas ya establecidas. Luego, con los tiempos de retención obtenidos se calculó el % RSD que es el parámetro que indica si hay o no repetitividad. En la tabla 5 se indican estos parámetros

**Tabla 5. Tiempos de retención y % RSD de la cocaína.**

	<b>DATO</b>									
<b>TIEMPOS DE RETENCIÓN</b>	3.98	4.05	3.95	4.03	3.97	4.01	3.97	4.05	4.01	4.03
<b>PROMEDIO <math>t_r</math> (min)</b>	4.01									
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	0.036									
<b>% RSD</b>	0.898									

En la tabla anterior se muestra que el % RSD es de 0.898 %, menor del 5 %, lo que indica la repetitividad del tiempo de retención de la cocaína en el sistema cromatográfico.

## **7.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

**7.2.1 Linealidad.** Se realizaron tres (3) curvas de calibración con rangos de concentración de 10 ppb a 20 ppb, de 20 ppb a 100 ppb y de 100 ppb a 1000 ppb con coeficientes de correlación de 0.9965, 0.9947 Y 0.9973 respectivamente como se ilustra en las figuras 11, 12 Y 13. Estas curvas se realizaron con las condiciones cromatográficas establecidas reportadas en la tabla 4.

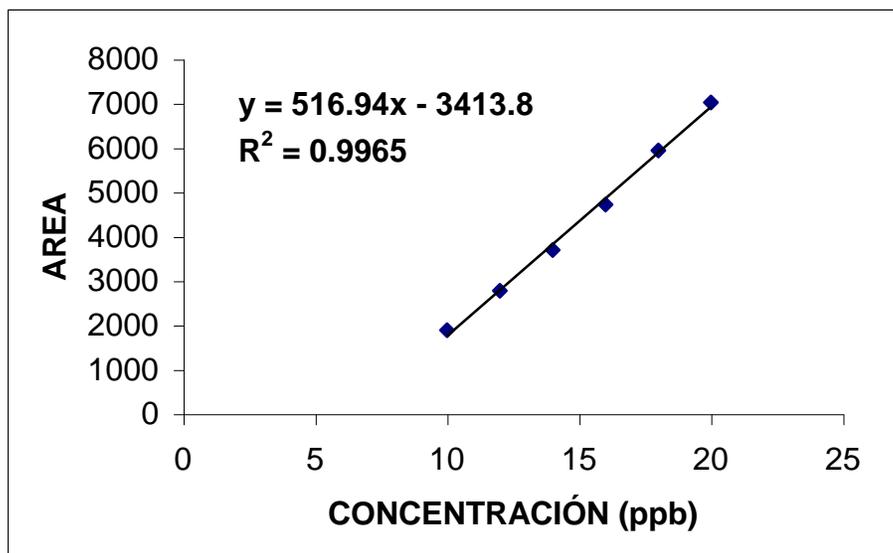


Figura 11. Curva de calibración de cocaína de 10 ppb a 20 ppb.

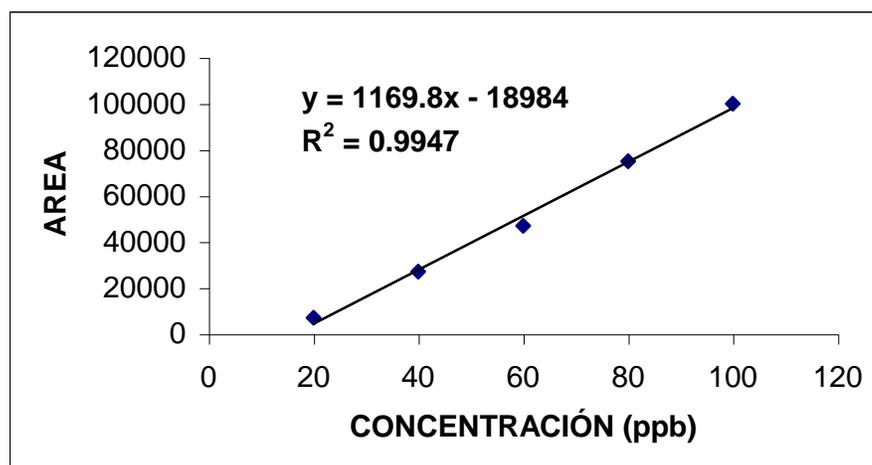
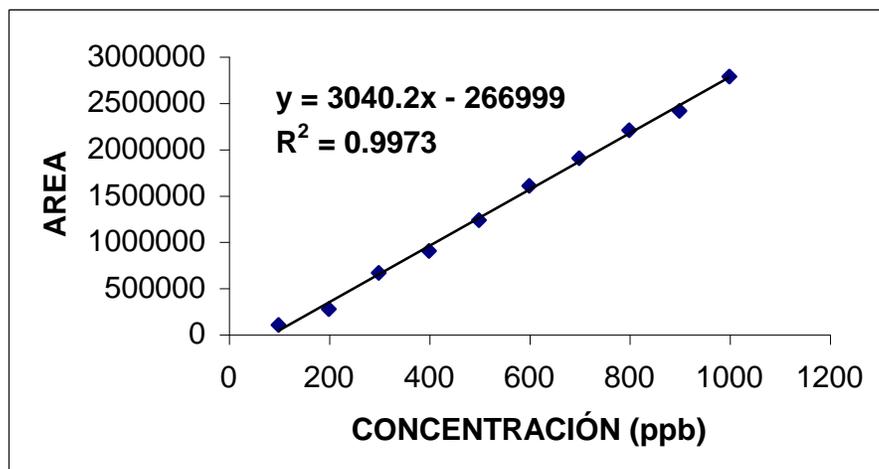


Figura 12. Curva de calibración de cocaína de 20 ppb a 100 ppb.



**Figura13. Curva de calibración de cocaína de 100 ppb a 1000 ppb.**

De acuerdo a las gráficas anteriores y los coeficientes de correlación obtenidos (valores próximos a 1), se demuestra la linealidad que presenta la cocaína dentro del rango de las concentraciones trabajadas. Las inyecciones en el cromatógrafo líquido fueron hechas por triplicado, con el fin de validar el método.

Por otro lado, si observamos las pendientes de las curvas de calibración, la que presenta una mayor pendiente es la realizada en un rango de concentración de 100 ppb a 1000 ppb, lo cual indica que en este rango de concentraciones el método presenta mayor sensibilidad.

## 7.2.2 Sensibilidad

**7.2.2.1 Límite de detección (LOD).** Para calcular el límite de detección, se utilizaron los datos de la curva de calibración que contiene los rangos de concentración más bajos; de 10 a 20 ppb de cocaína (tabla 6), y cada punto se inyectó por triplicado; con este rango de concentraciones se realizó el cálculo de la mínima concentración detectada de cocaína, haciendo uso de la siguiente ecuación (Ec. 1).<sup>24</sup>

$$Y = Y_B + 3 S_B \quad (\text{Ec. 1})$$

Con la anterior ecuación se obtuvieron los valores que se reportan en la tabla 7.

**Tabla 6. Datos para calcular límites de detección de la cocaína en HPLC.**

CONCENTRACIÓN (ppb)	AREA
10	1890
12	2811
14	3694
16	4723
18	5938
20	7023

$$m = 516.94$$

$$b = -3413.8$$

$$R^2 = 0.9965$$

**Tabla 7. Límite de detección para cocaína.**

DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA PENDIENTE ( $S_b$ )	INTERCEPTO CON EJE Y ( $Y_B$ )	VALOR Y	LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) (ppb)
1655.120	-3413.8	1551.56	0.088

Como se muestra en la tabla 7, el límite de detección para la cocaína es de 0.088 ppb. A concentraciones más bajas las señales obtenidas no eran lineales, por lo cual se descartaron para hacer más fácil la cuantificación de la cocaína.

**7.2.2.2 Límite de cuantificación (LOQ).** Para realizar este cálculo, se utilizó la misma curva de calibración que para el LOD (tabla 6), igualmente cada punto se inyectó por triplicado y se realizó el calculo utilizando la ecuación 2.<sup>24</sup>

$$Y = Y_B + 10 S_B \quad (\text{Ec. 2})$$

**Tabla 8. Límite de cuantificación para cocaína.**

DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA PENDIENTE ( $S_B$ )	INTERCEPTO CON EJE Y ( $Y_B$ )	VALOR Y	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ) (ppb)
1655.120	-3413.8	13137.4	0.295

En la tabla anterior se puede ver el valor mínimo cuantificable de 0.295 ppb, lo cual indica que el detector UV es el ideal ya que tiene una buena sensibilidad para generar una señal mínima de este compuesto. A concentraciones inferiores, los valores de desviación estándar son superiores y no se da un coeficiente de correlación aceptable, afectando así, la linealidad de la curva.

### 7.2.3 Precisión

**7.2.3.1 Repetitividad.** Para su determinación, se utilizaron las soluciones de cocaína de las curvas de trabajo, las cuales se inyectaron en el Cromatógrafo Líquido por triplicado. Se calculó la desviación estándar y la desviación estándar relativa de las áreas con el fin de evaluar la repetitividad.

En las tablas 9, 10 y 11, se muestran las desviaciones estándar de las áreas.

**Tabla 9. Datos de las áreas y sus respectivas desviaciones estándar para la cocaína en un rango de concentraciones de 10-20 ppb.**

CONCENTRACIÓN (ppb)	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	ÁREA PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	RSD (%)
10	1824	1890	1981	1898.33	78.831	4.153
12	2744	2839	2850	2811.00	58.284	2.073
14	3694	3586	3597	3625.67	59.433	1.639
16	4676	4723	4576	4658.33	75.076	1.612
18	5938	5975	6041	5984.67	52.176	0.872
20	6898	7023	7064	6995.00	86.470	1.236

**Tabla 10. Datos de las áreas y sus respectivas desviaciones estándar para la cocaína en un rango de concentraciones de 20-100 ppb.**

CONCENTRACIÓN (ppb)	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	ÁREA PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	RSD (%)
20	6898	7023	7064	6995	86.470	1.236
40	27000	27685	26522	27069	584.562	2.159
60	46781	47000	47063	46948	148.017	0.315
80	75001	74893	75862	75252	531.028	0.706
100	106831	107045	108303	107393	795.314	0.741

**Tabla 11. Datos de las áreas y sus respectivas desviaciones estándar para la cocaína en un rango de concentraciones de 100-1000 ppb.**

CONCENTRACIÓN (ppb)	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	ÁREA PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	RSD (%)
100	106831	107045	108303	107393.00	795.314	0.741
200	260595	269958	272657	267736.67	6330.379	2.364
300	668465	658151	656864	661160.00	6358.959	0.962
400	898230	901828	893516	897858.00	4168.468	0.464
500	1255891	1260075	1161562	1225842.67	55707.985	4.544
600	1600753	1607620	1613943	1607438.67	6596.869	0.410
700	1892933	2001002	1911098	1935011.00	57867.097	2.990
800	2265449	2290629	2185056	2247044.67	55140.314	2.454
900	2380446	2444075	2403623	2409381.33	32202.969	1.337
1000	2698457	2874876	2857561	2810298.00	97243.299	3.460

En las tablas anteriores se puede observar que el RSD está entre 0.315 % a 4.544 %; de tal manera que el método cromatográfico es repetitivo dentro del rango de concentraciones examinado, ya que la desviación estándar relativa no sobrepasa el valor estipulado que es del 5 %, criterio de aceptación para el análisis de cocaína.<sup>6</sup>

**7.2.3.2 Reproducibilidad.** Para determinar la reproducibilidad, se inyectó por tres (3) días consecutivos una sola vez por día, soluciones patrón de cocaína de 20 - 500 y 1000 ppb; con los resultados obtenidos de las áreas, se calculó la desviación estándar relativa, obteniéndose los datos que se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12. Datos de las relaciones de áreas y desviaciones estándar.**

CONCENTRACIÓN (ppb)	AREA 1	AREA 2	AREA 3	AREA PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA RSD (%)
20	7304	7128	7249	7227.00	99.534	1.377
500	1257499	1368682	1310735	1312305.33	55608.132	4.237
1000	2608457	2805020	2598053	2670510.00	116605.171	4.366

De estos datos se concluye que el método es reproducible, ya que la desviación estándar relativa calculada es menor del 5 %, lo que indica una buena reproducibilidad del método.

#### **7.2.4 Exactitud**

La exactitud se determinó evaluando la recuperación de cocaína con concentraciones de 10 - 20; 20 - 100 y 100 - 1000 ppb, las cuales se inyectaron por triplicado. Se trabajó con los valores de la relación de áreas en cada una de las curvas de trabajo; el porcentaje de recuperación (R) promedio se establece del promedio de R de cada concentración, obteniéndose así, tres concentraciones promediadas para dar la concentración obtenida para cada curva.

En las tablas 13, 14 y 15, se muestran el porcentaje de recuperación y las concentraciones utilizadas para evaluar la exactitud y el porcentaje de recuperación correspondiente al valor de la concentración que da la señal respecto a la concentración del estándar preparado.

**Tabla 13. Datos de los porcentajes de recuperación de las áreas de la cocaína para la curva de 10-20 ppb.**

<b>CONCENTRACIÓN (ppb)</b>	<b>% RECUPERACIÓN</b>			<b>R: 99.811</b> <b>S: 0.295</b> <b>RSD (%): 0.296</b> <b>t<sub>obt</sub>: 1.916</b>
10	100.00	100.00	99.886	
14	99.464	100.00	100.00	
18	99.587	100.00	99.362	

**Tabla 14. Datos de los porcentajes de recuperación de las áreas de la cocaína para la curva de 20-100 ppb.**

<b>CONCENTRACIÓN (ppb)</b>	<b>% RECUPERACIÓN</b>			<b>R: 99.420</b> <b>S: 0.856</b> <b>RSD (%): 0.861</b> <b>t<sub>obt</sub>: 2.021</b>
20	100.00	99.132	100.00	
60	98.322	99.150	100.00	
100	100.00	100.00	98.174	

**Tabla 15. Datos de los porcentajes de recuperación de las áreas de la cocaína para la curva de 100-1000 ppb.**

<b>CONCENTRACIÓN (ppb)</b>	<b>% RECUPERACIÓN</b>			<b>R: 99.671</b> <b>S: 0.564</b> <b>RSD (%): 0.566</b> <b>t<sub>obt</sub>: 1.744</b>
200	99.816	100.00	100.00	
600	100.00	99.233	100.00	
1000	100.00	98.458	99.536	

El t de student ( $t_{obt}$ ) se realizó con el fin de establecer la exactitud del método analítico. Para que haya exactitud, es necesario que el  $t_{obt}$  sea menor que el  $t_{tabla}$ . Este último valor se tomó teniendo en cuenta el número total de inyecciones realizadas (áreas); de esta manera

el  $t_{\text{tabla}}$  tiene un valor de 2.31 para ocho (8) grados de libertad y un 95 % de confianza. De acuerdo con los datos obtenidos en las tablas 13, 14 y 15, se puede verificar la exactitud del sistema, ya que el  $t_{\text{obt}}$  fue menor al  $t_{\text{tabla}}$ .

### 7.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN

**7.3.1 Dopaje y extracción.** Se realizaron varias pruebas de extracción basadas en reportes bibliográficos, con el fin de escoger una metodología en la que se pudieran lograr porcentajes de recuperación entre el 90 y 100 %. La técnica de extracción escogida fue la extracción en fase sólida (SPE), debido a sus mejores resultados para la cocaína reportados frente a la extracción líquido- líquido. El montaje para esta extracción se observa en la figura 4; y en el diagrama 2, se muestra el procedimiento ya optimizado para las extracciones.

Cada una de las muestras de orina se doparon a tres (3) concentraciones diferentes: 20, 500 y 1000 ppb; y luego de la extracción, cada concentración se inyectó en el cromatógrafo por triplicado. El dopaje se realizó por triplicado. En la tabla 16 se observan los datos de los resultados de la estandarización de la SPE con cartuchos C<sub>18</sub>.

**Tabla 16. Datos para evaluar la exactitud en el sistema de extracción (SPE).**

ESTÁNDAR	%RECUPERACIÓN PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	% RSD	N° MUESTRAS	VALOR DE $t_{\text{obt}}$	VALOR DE $t_{\text{tab}}$
Cocaína	96.982	3.826	3.945	9	2.295	2.31

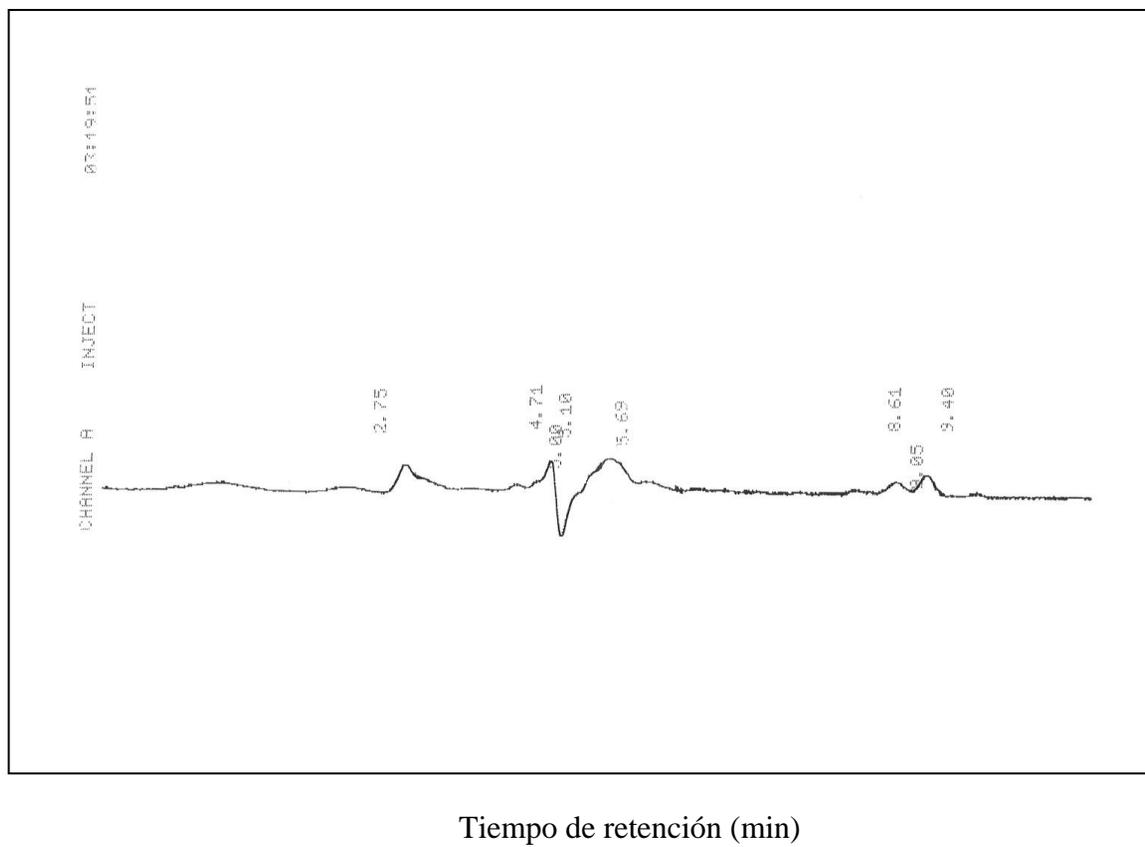
Al igual que para la validación del método cromatográfico, la exactitud del sistema de extracción se realizó mirando la recuperación de las áreas en cada una de las concentraciones utilizadas para evaluar la exactitud (20-500 y 1000 ppb), con su respectivo

valor de  $t_{obt}$ . El  $t$  de student se aplicó a nueve (9) muestras, y el  $t_{tab}$  para ocho (8) grados de libertad y un 95 % de confianza, tiene un valor de 2.31.

En la tabla 16 se observa que el porcentaje de recuperación promedio es de 96.982, que es un valor óptimo comparado con otros métodos de extracción;<sup>22</sup> y el  $t_{obt}$  es de 2.295. Según esto, el  $t_{obt}$  es menor que el  $t_{tab}$ , demostrándose así la relación del porcentaje de recuperación con la concentración que da la señal respecto a la cocaína extraída; por tanto se comprueba la validez de la técnica de extracción.

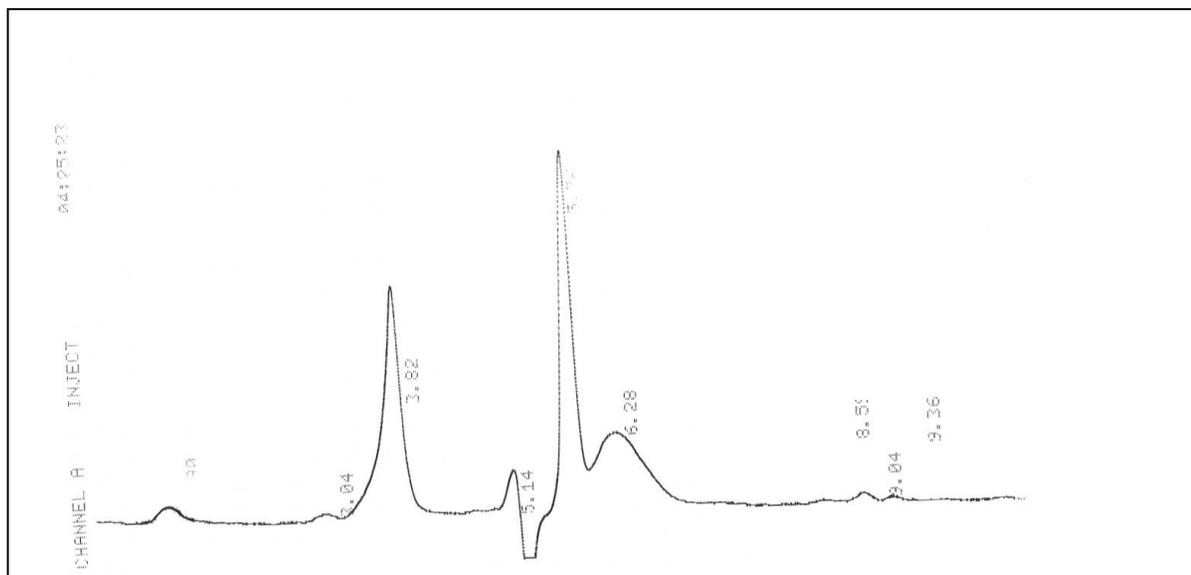
Con el fin de descartar cualquier tipo de contaminación en las muestras, se realizó un blanco con un cartucho nuevo y los solventes utilizados en la extracción. En la figura 14 se observa el cromatogramas de un blanco de cartucho y solventes, que ayuda a descartar interferencias en el análisis, ya que hay estudios donde se han encontrado impurezas en los cromatogramas debidas a los solventes o a los cartuchos.

AU



**Figura 14. Cromatograma del blanco del cartucho y solventes utilizados en la SPE**

AU



PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	24.686	0.9	13803	01
2	0.3	3.04	14494	02
3	11.284	3.82	645714	03
4	2.871	5.14	138863	02
5	20.007	5.76	967515	02
6	16.142	6.28	788647	03
7	0.195	8.59	9429	02
8	0.4	9.04	19321	02
9	0.18	9.36	8694	03

Tiempo de retención (min)

Figura 15. Cromatograma de una muestra de orina dopada

La figura 15 muestra un cromatograma de una muestra de orina dopada con 500  $\mu\text{L}$  de cocaína de 1.0 ppm; se puede ver un pico resuelto y bien definido, se observa que no hay interferencias significativas de la matriz en el proceso de extracción de la cocaína de la orina.

**7.3.2 Análisis cromatográfico de muestras de orina de consumidores de bazuco.** Se realizó un muestreo en los barrios: Los Sauces, Alfonso López y Treinta y uno de Marzo, ubicados en el Municipio de Popayán. En la tabla 17 se reportan algunos datos de las muestras que presentaron interés para la investigación, puesto que no en todas las muestras se encontró cocaína .

**Tabla 17. Datos de las muestras analizadas**

MUESTRA	SEXO	EDAD (Años)	TEMPERATURA °C	pH
1	Masculino	36	32	6.6
2	Femenino	19	30	6.0
3	Masculino	25	29	6.8
4	Masculino	25	35	6.5
5	Masculino	35	35	6.0
6	Femenino	30	32	6.0
7	Femenino	22	34	6.6
8	Masculino	22	37	6.8
9	Femenino	28	35	6.8

La temperatura se tomó después de cinco (5) minutos de su colección; y el pH a las cuatro (4) horas. Dichas muestras fueron llevadas al laboratorio, en donde se guardaron en nevera a 4°C; posteriormente, las muestras se filtraron con filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro para eliminar

impurezas. Seguidamente se realizó la SPE y la concentración de las muestras con corriente de nitrógeno. Con el fin de comprobar la efectividad de la técnica establecida, cada muestra se inyectó por triplicado en el Cromatógrafo Líquido para continuar así con el análisis cromatográfico. De las 15 muestras analizadas, solamente se encontró cocaína en 9 muestras. Los resultados obtenidos se reportan en la tabla 18.

**Tabla 18. Concentración promedio real de la cocaína en la orina.**

MUESTRA	$t_R$ (min)	CONCENTRACIÓN AL INTERPOLAR (ppb)	CONCENTRACIÓN REAL DE COCAÍNA EN ORINA (ppb)
1	3.69	34.393	0.573
2	3.87	27.531	0.459
3	3.88	31.931	0.532
4	3.88	30.317	0.505
5	4.00	24.986	0.416
6	3.88	16.251	0.271
7	4.02	43.084	0.718
8	3.74	23.118	0.385
9	3.95	28.678	0.478

En la tabla 19 se reportan las desviaciones estándar de los tiempos de retención para la muestra y para el estándar de cocaína; con el fin de describir la precisión de los datos.

**Tabla 19. Datos de tiempos de retención de muestra y estándar de cocaína, y sus respectivas desviaciones estándar.**

$t_R$	TIEMPOS DE RETENCIÓN (min)									$t_R$	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	RSD %
										Promedio		
Estándar	3.98	4.05	3.95	4.03	3.97	3.88	3.90	4.04	4.01	3.98	0.06	1.51
Muestra	3.69	3.87	3.88	3.88	4.00	3.88	4.02	3.74	3.95	3.88	0.11	2.84

En la tabla anterior se puede apreciar que el tiempo de retención promedio de las muestras 3.88 minutos, es muy similar al tiempo de retención promedio del estándar de cocaína que es de 3.98 minutos; también se puede observar que las desviaciones estándar calculadas para el estándar y la muestra, son menores del 5 %, lo que indica la concordancia entre los valores numéricos de las mediciones; estos resultados demuestran que el análisis cromatográfico es preciso.

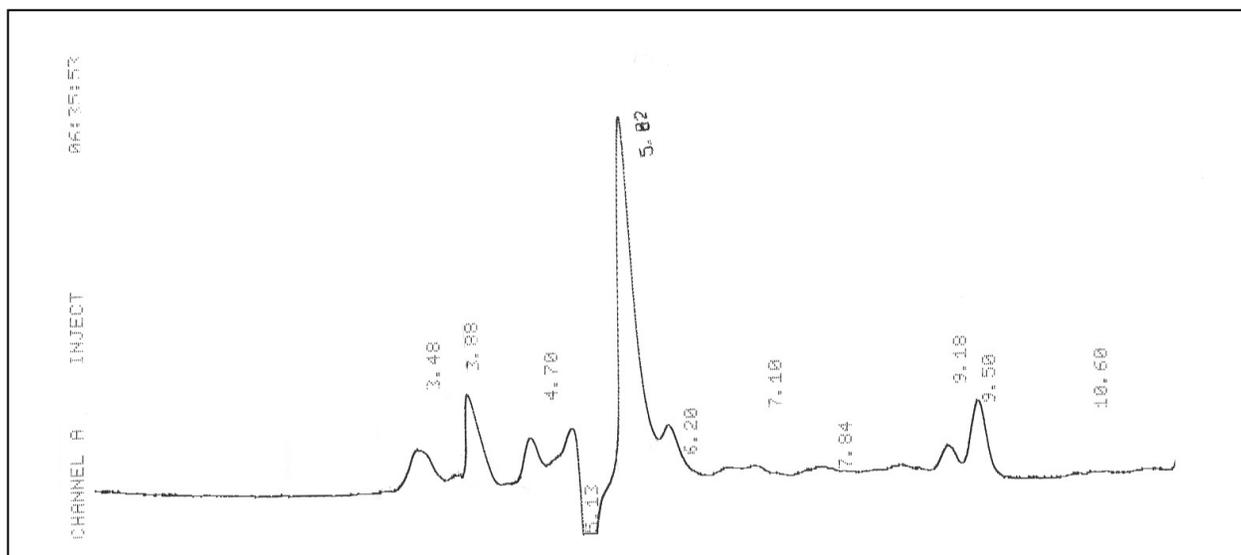
La concentración real se encuentra en un rango de 16.251 ppb a 43.084 ppb, al hacer la interpolación del área del pico cromatográfico en la curva de calibración de la figura 12. Haciendo la relación de dilución a 30 mL que fue la cantidad de muestra tomada, se encontró que la concentración real de cocaína en la orina se encuentra en un rango de 0.271 ppb a 0.718 ppb.

Los niveles de toxicidad de la cocaína reportados por la Organización Mundial de la Salud, se encuentran en un rango entre 15 y 35 ppm en la orina.<sup>39</sup> Según este reporte, la población estudiada presenta bajos niveles de cocaína (0.271 – 0.718 ppb), no indicando con esto que no hay riesgo de muerte, puesto que las concentraciones de cocaína y de sus metabolitos en fluidos biológicos varía ampliamente y no predicen la gravedad de los hallazgos.

Los niveles obtenidos de cocaína en este estudio, no dicen claramente los efectos adversos que se puedan tener por el consumo de bazuco, puesto que la cocaína y los metabolitos pueden actuar sobre una función del organismo y no sobre otra, dependiendo de la persona que lo consume; es el caso de los consumidores habituales como es la población estudiada, los cuales pueden mostrarse tolerantes y adaptados al consumo de drogas.

La figura 16 muestra el cromatograma de la muestra de orina numero 6 a las condiciones cromatográficas establecidas.

AU



```
FILE 1. METHOD 8. RUN 11
ANALYST: W
PEAK# AREA% RT AREA BC
1 0.588 3.48 99565 02
2 0.078 3.88 113222 03
3 1.261 4.7 213475 02
4 2.268 5.13 383762 02
5 21.17 5.82 982756 02
6 2.21 6.2 374042 02
7 2.657 7.1 449601 02
8 0.868 7.84 146815 03
9 0.239 9.18 40477 02
10 0.74 9.5 125280 03
11 0.258 10.6 43654 02
```

Tiempo de retención (min)

Figura 16. Cromatograma de la muestra N° 6

## 8. CONCLUSIONES

- ◆ La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), con detección Ultravioleta, demostró ser una técnica adecuada y una herramienta útil para la confirmación de la existencia de cocaína en orina y para su determinación cuantitativa.
  
- ◆ Se lograron optimizar los parámetros cromatográficos tales como: linealidad en el rango de trabajo, precisión, exactitud y sensibilidad del método, para la estandarización de una metodología analítica que permitiera determinar cocaína en orina de una forma eficiente y confiable.
  
- ◆ El tratamiento de las muestras es un factor decisivo para el análisis cromatográfico de la cocaína en orina, en este sentido la técnica de extracción en fase sólida, utilizando cartuchos C<sub>18</sub> como fase estacionaria, resultó ser una excelente técnica de separación, ya que los cartuchos utilizados retienen la cocaína de manera eficiente, lográndose así un porcentaje de recuperación satisfactorio del 96.982 %.
  
- ◆ En las muestras de orina analizadas, se encontraron concentraciones de cocaína en un rango de 0.271 ppb a 0.718 ppb, los cuales se encuentran por debajo de los niveles de toxicidad reportados por la Organización Mundial de la Salud.

## **RECOMENDACIONES**

## BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> ANTONILLI, Leticia y SURIANO, Carmen. Analysis of cocaethylene, benzoylecgonine and cocaine in human urine by high-performance thin-layer chromatography with ultraviolet detection: a comparison with high-performance liquid chromatography. En: Journal of Chromatography (B). Vol 751, (2001); p 19-27.
- <sup>2</sup> BUJÁN, L y FERNÁNDEZ, P. Comparison of two chromatographic methods for the determination of cocaine and its metabolites in blood and urine. En: Analytical Letters. Vol 34, (2001); p 2263-2275.
- <sup>3</sup> BURBANO, Liliana. Estudio Citotóxico y Genotóxico “in Vitro” del bazuco, cigarrillo y su mezcla en linfocitos humanos sin activación metabólica. En: Tesis UNICAUCA 1996.
- <sup>4</sup> CASALE, John F y MOORE, James M. Detection and determination of Pseudococaine in Coca Leves and illicit Cocaine Samples. En: Journal of Forensic Sciences. Nov 1994; p 1537-1543.
- <sup>5</sup> CASALE, John F y WAGGONER, Richard W. A chromatographic impurity signature profile Analysis for Cocaine using capillary Gas chromatography. En: Journal of Forensic Sciences. Sep 1991; p 1312-1330.
- <sup>6</sup> CHRISTENSEN, R G. The Certification of Cocaine and Benzoylecgonine in a Human urine Standard Reference Material. En: Journal of Analytical Toxicology. Vol 16,(1992); p 158-162.

<sup>7</sup> CONE, Edward J y HILLSGROVE, Mary. Sweat Testing for Heroin, Cocaine, and Metabolites. En: Journal of Analytical Toxicology. Vol 18, (1994); p 298-305.

<sup>8</sup> CONE, Edward J y MENCHEN, Sandra L. Validity Testing of Commercial Urine Cocaine Metabolite Assays: I Assay Detection Times, Individual Excretion Patterns, and Kinetics After Cocaine Administration to Humans. En: Journal of Forensic Sciences. Vol 34, Number 1, (1989); p 15-31.

<sup>9</sup> CONE, Edward J y YOUSEFNEJAD, David. Testing Human Hair for Drugs of Abuse. II. Identification of unique Cocaine Metabolites in Hair of Drug Abusers and Evaluation of Decontamination Procedures. en: Journal of Analytical Toxicology. Vol 15, (1991); p 250-255.

<sup>10</sup> CORDOBA, Darío y TOLEDO, Daniel. Toxicología. Ed Medellín S.A. Medellín. 1997. p 313-324.

<sup>11</sup> FERNANDEZ, P y LAFUENTE, N. HPLC Determination of Cocaine and Benzoylcegonine in Plasma and Urine from Drug Abusers. En: Journal of Analytical Toxicology. Vol 20, (1996); p 224-2288.

<sup>12</sup> GILBERT, J A. Investigación Toxicológica. En: Medicina Legal y Toxicología 1991. p 580-591.

<sup>13</sup> GURKEERAT, Singh y VINOD, Arora. A Validated Stable Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Assay for the Trace Analysis of Cocaine and its Major Metabolites in Plasma. En: Analytical Chemistry. Vol 71, (1999); p 2021-2027.

<sup>14</sup> HOLVIN, J. Cultura y civismo. En: Órgano de difusión del ICFES. Numero 1, (1993). p 11-14.

- <sup>15</sup> ISAZA, José. Extracción en fase sólida, fundamentación y desarrollo de aplicaciones. En: Scientia et Technica. Número 3, (1993); p 147-169.
- <sup>16</sup> MOORE, James M y CASALE, John F. Determination and in-depth chromatographic analyses of alkaloids in south American and green house-cultivated coca leaves. En: Journal of Chromatography. Vol 659, (1994); p 163-175.
- <sup>17</sup> NAVAS, Goy E; SEVILLANO, Erna y DÍAZ, Rosángela. Control analítico de “Doping”. Fase 1: estandarización de pruebas sencillas, fáciles y de bajo costo para la confirmación de drogas de abuso en la orina. En: Centro de Investigaciones e información de medicamentos y tóxicos.2003.
- <sup>18</sup> PHILLIPS, Daniel L; TEBBET, Lean R y BERTHOF, Roger. Comparison of HPLC and GC-MS for measurement of Cocaine and metabolites. En: Journal of Analytical Toxicology. Vol 20. N° 5. Sep 1996; p 305-308.
- <sup>19</sup> RIVERA, Álvaro. Adicción a las drogas. En: Comportamiento y Salud 1997. p 243-246.
- <sup>20</sup> ROA, Jaime A y ECHANDIA, Carlos A. Rastreo de cocaína en orina de recién nacidos hijos de madres consumidoras. En: Colombia Médica. Vol 34, (2003); p 23-30.
- <sup>21</sup> SÁNCHEZ, Juan. Aspectos analíticos de la determinación de drogas en fluidos biológicos. En: Toxicología Forense 1995. p 1-14.
- <sup>22</sup> SÁNCHEZ B, Juan F y GRANADA F,Mario. Drogas de abuso. Toxicología analítica de la cocaína. En: Instituto de Medicina Deportiva. Cuba 2003.
- <sup>23</sup> SERNA, Camilo. Intoxicación por pasta de cocaína (bazuco). En: Toxicología programada 1994. p 147-149.

- <sup>24</sup> SKOOG, Douglas. Análisis Instrumental. Ed Mc Graw-Hill. México.1994. p 730-732.
- <sup>25</sup> SUBHASH, C y JAMDAR, Carol. A Rapid, Sensitive Assay for Cocaine and Its Metabolites in Biological Fluids Using Solid – Phase Extraction and High- Performance Liquid Chromatography. En: Journal of Analytical Toxicology. Vol 24, (2000); p 438- 441.
- <sup>26</sup> SUN, Lei y HALL, Gene. High-performance liquid chromatographic determination of cocaine and its metabolites in serum microsamples with fluorimetric detection and its application to pharmacokinetics in rats. En: Journal of Chromatography (B). Vol 745, (2000); p 315-322.
- <sup>27</sup> TATSUNO, M y NISHIKAWA, M. Simultaneous Determination of Illicit Drugs in Human Urine by liquid Chromatography-Mass Spectrometry. En: Journal of Analytical Toxicology. Vol 20. N° 5. Sep (1996). p 281- 286.
- <sup>28</sup> VALCARCEL, M. Técnicas Analíticas de separación. Ed Reverté S.A. Barcelona 1994. p 437-482.
- <sup>29</sup> VELÁSQUEZ, E. BASUCO:¿Qué sabe hasta el momento?. En: Revista de Colciencias. Vol 11. Numero 38, (1993). p 4-15.
- <sup>30</sup> WILLARD, H. Cromatografía Líquida. En: Métodos instrumentales de análisis. México 1988. p 322-330.
- <sup>31</sup> [www.popayán.gov.co/pot](http://www.popayán.gov.co/pot).
- <sup>32</sup> [www.thodiwn.ws/chemistry/cocaine.illicit.production](http://www.thodiwn.ws/chemistry/cocaine.illicit.production).
- <sup>33</sup> [www.geocities.com](http://www.geocities.com).

<sup>34</sup> [www.coca.htm](http://www.coca.htm)

<sup>35</sup> [www.uninet.edu/](http://www.uninet.edu/)

<sup>36</sup> [www.chem.cinvestav.mx/welcome.htm](http://www.chem.cinvestav.mx/welcome.htm)

<sup>37</sup> [www.ist-spe.com](http://www.ist-spe.com)

<sup>38</sup> [www.nuestracolombia.org.co/m-noticiascauca](http://www.nuestracolombia.org.co/m-noticiascauca)

<sup>39</sup> [www.mju.es/toxicología/sitsevittab.htm](http://www.mju.es/toxicología/sitsevittab.htm)

## **ANEXOS**

## I. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

### TIEMPO MUERTO: $t_M$

El tiempo muerto es el que se requiere para que una especie no retenida pase a través de una columna.

### TIEMPO DE RETENCIÓN: $t_R$

El tiempo de retención es el tiempo entre la inyección de una muestra y la aparición del pico de un soluto en el detector de la columna cromatográfica.

### FACTOR DE CAPACIDAD: $K$

El factor de capacidad o de retención es un parámetro experimental importante que se utiliza para describir las velocidades de migración de solutos en columnas. De manera ideal, los factores de retención para los analitos de una muestra deben estar entre 1 y 5.

$$K = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

### EFICIENCIA DE LA COLUMNA: $N$

La eficiencia de las columnas cromatográficas aumenta a medida que es mayor el número de platos ( $N$ ) y la altura equivalente del plato teórico ( $H$ ) es mayor.

La eficiencia de la columna se define como:

$$N = \frac{L}{H} \quad (2)$$

En donde **L** es la longitud del empaque de la columna, generalmente en **cm**.

El número de platos puede calcularse mediante una relación sencilla:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (3)$$

En donde **t<sub>R</sub>** es el tiempo de retención y **w** es el ancho de banda.

Para obtener **H** (AEPT), se mide la longitud de la columna **L**, se calcula el número de platos y se aplica a la ecuación (2).

## II. VAIDACIÓN DEL MÉTODO

### LINEALIDAD

Cuando se emplea el método de los mínimos cuadrados para generar una curva de calibración, se debe partir de dos suposiciones. La primera es que exista una relación lineal entre la variable medida (**y**), y la concentración del analito (**x**). La relación matemática que describe esta suposición se denomina modelo de regresión, que se representa con la ecuación:

$$y = mx + b \quad (4)$$

Donde **m** es la pendiente y **b** es el intercepto con el eje Y.

El análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados proporciona la ecuación para la mejor recta a través de un conjunto de pares de datos **x, y**, cuando existe una relación lineal entre las dos variables y los datos en **x** contienen un mínimo de incertidumbre.

## PRECISIÓN

La precisión es una medida de la concordancia de los resultados con los de otros obtenidos exactamente en la misma forma. Este término se utiliza para describir qué tan reproducibles son las mediciones; es decir que tan semejantes son los resultados que se han obtenido exactamente de la misma manera. Por lo general, la precisión de una medición se puede determinar simplemente repitiendo la medición en porciones semejantes de la muestra. Para describir la precisión de un conjunto de datos repetidos se utilizan tres términos muy conocidos: la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación.

### Media de la muestra: $\bar{X}$

Es el valor promedio de una muestra limitada obtenida de una población de datos, y se define por la ecuación:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (5)$$

El símbolo  $\sum x_i$ , significa la suma de todos los valores,  $X_i$  de las muestras repetidas y  $n$  son las mediciones repetidas.

### Desviación estándar: $S$

La desviación estándar es una medida de la precisión o dispersión de una población de datos, y está dada por la ecuación:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (6)$$

### **Desviación estándar relativa: RSD**

Es el porcentaje de la desviación estándar y se calcula así:

$$RSD = \frac{S \times 100}{\bar{X}} \quad (7)$$

### **EXACTITUD**

El término exactitud indica qué tan cercana está una medición de su valor verdadero o aceptado, y se expresa como error. Para determinarla se utiliza el t de student.

$$t_{obt} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{RSD} \quad (8)$$

Donde R es la recuperación porcentual y  $t_{obt}$  es el valor de  $t$  obtenido experimentalmente.

El  $t_{obt}$  es comparado con el valor de  $t_{tab}$  (valor de t tabulado para n-1 grados de libertad); si  $t_{obt}$  es menor que  $t_{tab}$ , no existe diferencia significativa con el 100 % de recuperación, y de esta forma, la exactitud es aprobada.

### **SENSIBILIDAD**

La sensibilidad de un instrumento o de un método mide su capacidad de discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito, para lo cual se tiene que los

parámetros para evaluar la sensibilidad del método son los límites de detección y cuantificación.

**Límite de detección: (LOD)**

Es la concentración o peso mínimo de analito que pueden detectarse para un nivel de confianza dado, proporcionado una señal igual a la señal del blanco o señal de fondo,  $Y_B$ , mas 3 veces la desviación estándar,  $S_B$ , y se calcula así:

$$Y = Y_B + 3 S_B \quad (9)$$

Donde  $Y$  es el valor del límite de detección, este valor se reemplaza en la ecuación 4, donde  $x$  es la concentración del límite de detección.

**Límite de cuantificación: (LOQ)**

Es la concentración o peso del analito más pequeño con la que pueden realizarse medidas cuantitativas. Se expresa matemáticamente así:

$$Y = Y_B + 10 S_B \quad (10)$$

Donde  $S_B$  es la desviación estándar del blanco, y  $Y_B$  es la respuesta del blanco. El límite de cuantificación es el resultado de reemplazar el valor de  $Y$  en la ecuación 4.

### III. ESPECTRO INFRARROJO DE LA COCAÍNA

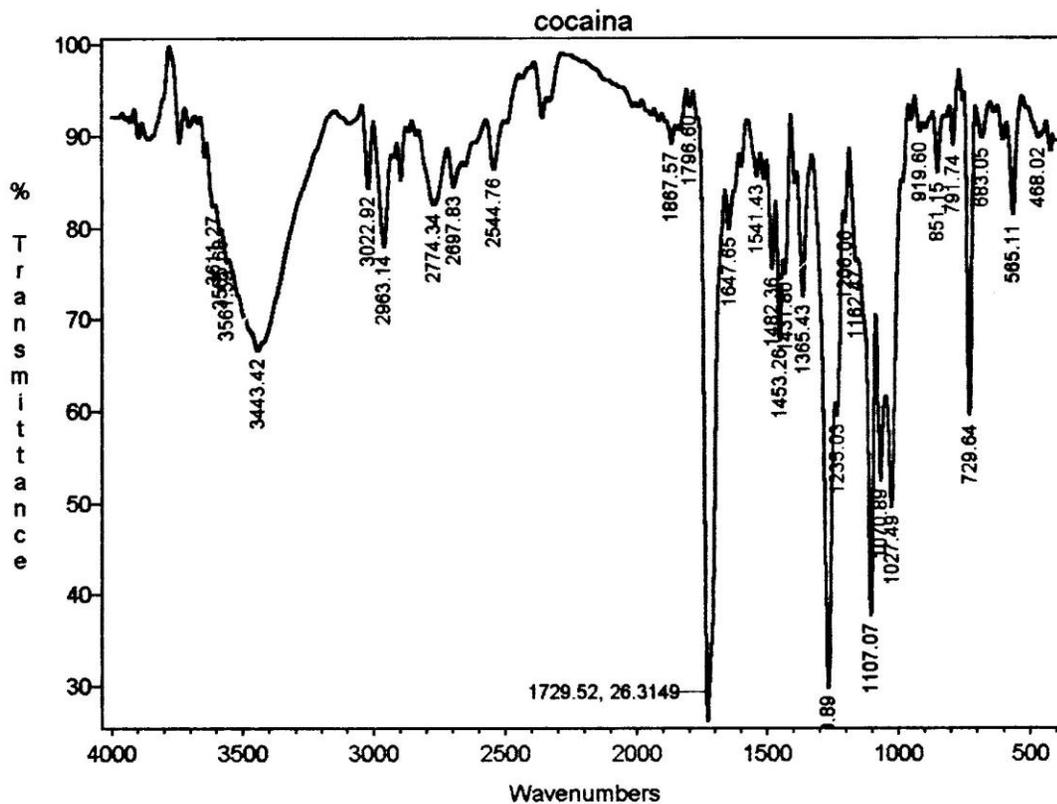


Tabla 19. Principales picos del espectro infrarrojo

RANGO DE FRECUENCIA (cm <sup>-1</sup> )	ENLACE
3443.42	Tensión C-H (aromático)
1729.52	Tensión RCOOR (éster)
1235.03	Tensión C-N (amina)
1107.07	Tensión C-O (éster -ácido)
729.62	Tensión C-H (aromático)