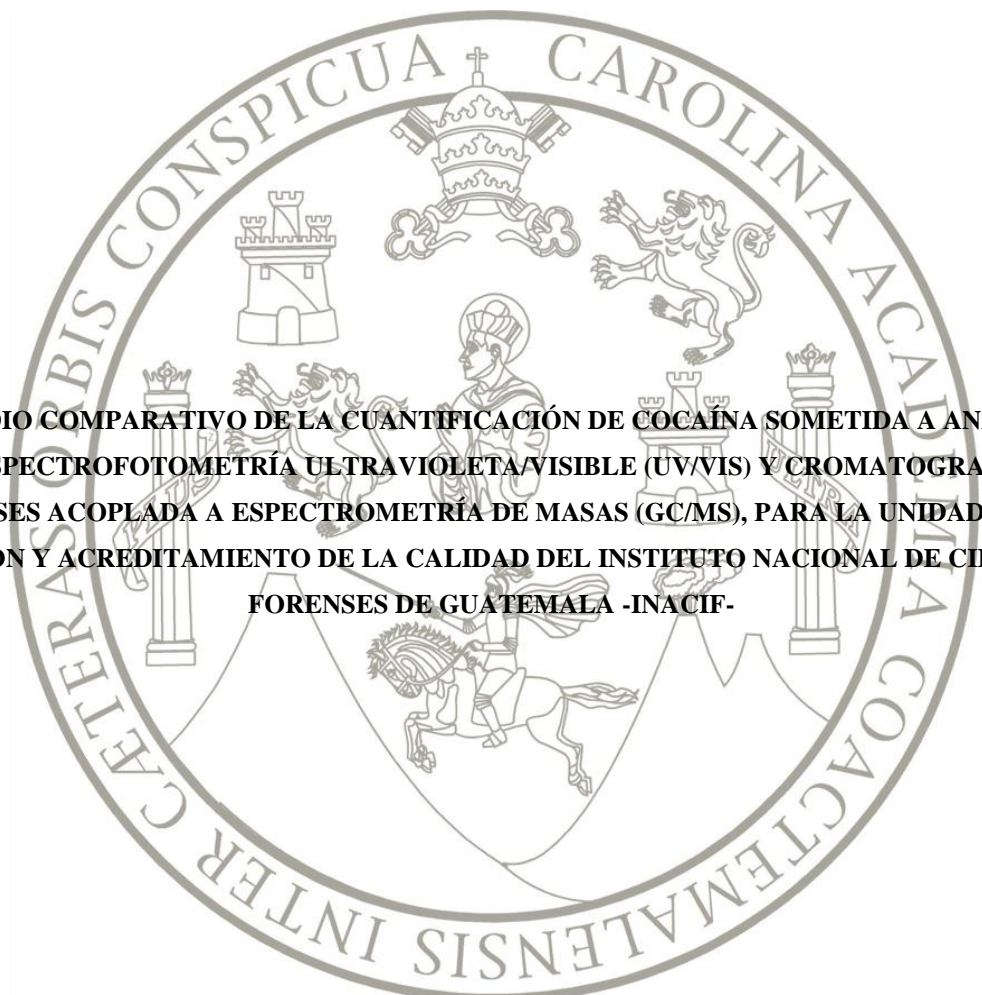


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

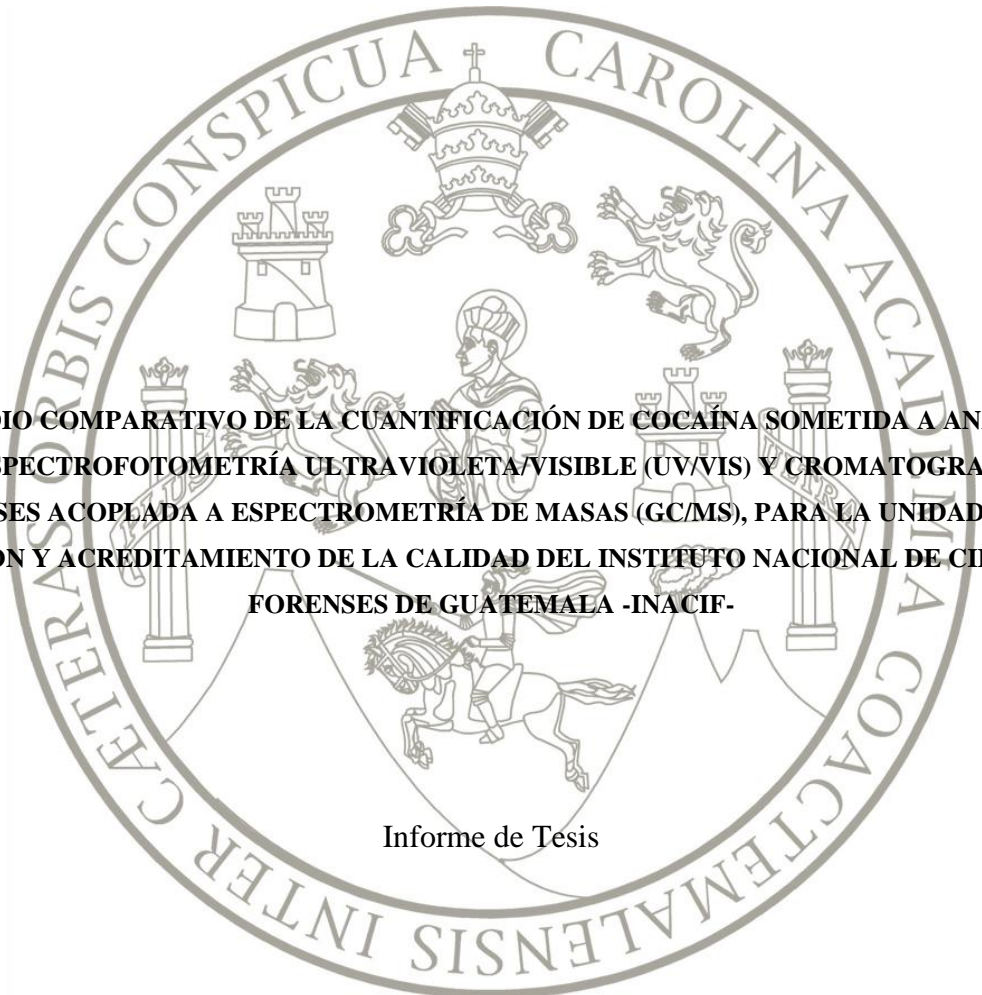
The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure on horseback, a crown above, and various heraldic symbols. The shield is flanked by two columns. The outer ring of the seal contains the Latin motto "CETERAS OBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" in capital letters.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CUANTIFICACIÓN DE COCAÍNA SOMETIDA A ANÁLISIS
POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA/VISIBLE (UV/VIS) Y CROMATOGRFÍA DE
GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS), PARA LA UNIDAD DE
GESTIÓN Y ACREDITAMIENTO DE LA CALIDAD DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
FORENSES DE GUATEMALA -INACIF-**

Rita María Miranda Ovalle
Química Farmacéutica

Guatemala, Noviembre de 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large circular emblem in the background. It features a central figure of a man on horseback, surrounded by various heraldic symbols including a crown, a lion, and a castle. The Latin motto "ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CÆTERAS" is inscribed around the perimeter of the seal.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CUANTIFICACIÓN DE COCAÍNA SOMETIDA A ANÁLISIS
POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA/VISIBLE (UV/VIS) Y CROMATOGRAFÍA DE
GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS), PARA LA UNIDAD DE
GESTIÓN Y ACREDITAMIENTO DE LA CALIDAD DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
FORENSES DE GUATEMALA -INACIF-**

Informe de Tesis

Presentado por
Rita María Miranda Ovalle

Para optar al título de
Química Farmacéutica

Guatemala, Noviembre de 2011

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.

Decano

Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.

Secretario

Licda. Liliana Vides de Urizar

Vocal I

Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares

Vocal II

Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli

Vocal III

Br. José Roy Morales Coronado

Vocal IV

Br. Cecilia Liska de León

Vocal V

DEDICATORIA

A DIOS

Por permitirme llegar a este momento en mi vida al lado de mis seres queridos. Por caminar a mi lado y cuidar mis pasos. Por cada regalo que inmerecidamente he recibido y por su infinito amor, estaré eternamente agradecida.

A MIS PADRES

Axel Miranda y Flory Ovalle de Miranda, por su apoyo sin condición o medida en cada momento de mi vida. Agradezco a Dios por hacer palpable su amor a través del hogar que me brindan. Sin su esfuerzo e incansable lucha, alcanzar esta meta no hubiera sido posible, el triunfo es de ustedes.

A MIS HERMANOS

Axel Rafael y Carmen Sofía, por su compañía, cariño y cada vivencia compartida

A MIS ABUELOS

Luis Ovalle⁺, Lucila de Ovalle⁺, Gerardo Miranda⁺. Soy afortunada porque en mi corazón guardo lo mejor de ustedes, su inmenso amor y ejemplo. A mi abuelita Laura de Miranda, por su cariño constante y por tenerme siempre en sus oraciones.

A MIS TIOS Y PRIMOS

Que en todo momento me han demostrado su amor y apoyo incondicional.

A MIS AMIGOS

Por brindarme su amistad y por los recuerdos que siempre llevaré en mi corazón.

A MI PAÍS

A mi amada patria Guatemala, mi inspiración.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala -INACIF-, por permitirme llevar a cabo mi Ejercicio Profesional Supervisado (EPS) y brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación. Un sincero agradecimiento a la Doctora Miriam Ovalle Gutiérrez de Monroy, por su apoyo, asesoría y estímulo.

A la Unidad de Gestión y Acreditamiento de la Calidad del INACIF, y al personal que he tenido la dicha de conocer desde los inicios de mi desempeño profesional. En especial a la Licenciada Ana Irene Pérez Schlosser, por brindarme su confianza, apoyo y amistad.

A la Licenciada Isabel Mata Lemus, por su valioso aporte durante la planificación y ejecución de este trabajo de investigación

Al personal de los Laboratorios de Toxicología y Sustancias Controladas del INACIF, agradezco de forma sincera su colaboración.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Por haberme dado la oportunidad de ingresar al sistema de Educación Superior y por sembrar en mí, el anhelo de construir un mejor país para todos.

Al personal docente de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por cada uno de los conocimientos transmitidos. Agradezco especialmente a la Licenciada Lillian Raquel Irving Antillón, por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo de investigación.

INDICE

1. Resumen	01
2. Introducción	03
3. Antecedentes	06
4. Justificación	07
5. Objetivos	09
6. Hipótesis	10
7. Materiales y Métodos	11
8. Resultados	30
9. Discusión de resultados	40
10. Conclusiones	45
11. Recomendaciones	47
12. Referencias bibliográficas	48
13. Anexos	52

I. RESUMEN

Se desarrolló una metodología analítica para la cuantificación de cocaína por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) en un rango de concentraciones de 5 $\mu\text{g/mL}$ a 30 $\mu\text{g/mL}$. Tomando como referencia este intervalo de concentraciones, se procedió a desarrollar como procedimiento alternativo para la cuantificación de la misma sustancia, una metodología empleando espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS), con el objeto de comparar si los resultados derivados de ambas metodologías arriban a los mismos valores y por lo tanto pueden emplearse indistintamente.

Previo a realizar la comparación de resultados de cuantificación, se consideró necesario evaluar si el intervalo de trabajo de ambas metodologías desarrolladas satisfacía los criterios de aceptación para linealidad, exactitud y precisión en términos de repetibilidad. Esto con el fin primordial de demostrar desde etapas iniciales del estudio, que las metodologías desarrolladas podían ser utilizadas en procedimientos de cuantificación. En el caso de obtener resultados desfavorables, debía considerarse nuevamente el intervalo de trabajo.

En la fase de evaluación, se demostró que la metodología por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) para la cuantificación de cocaína, cumple con los criterios de aceptación para las características de linealidad, exactitud y precisión en términos de repetibilidad. De la misma forma, la metodología por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) demostró que cumple con los criterios de aceptación anteriormente indicados.

Debido a que se cumplió con los criterios de aceptación establecidos previamente, se procedió a cuantificar quince muestras de cocaína -algunas de ellas adquiridas comercialmente como estándares de trabajo y otras proporcionadas por organismos internacionales como parte de programas de aseguramiento de la calidad- por ambas

metodologías desarrolladas. Se empleó el coeficiente de correlación de concordancia (R_c) para evaluar la equivalencia o reproducibilidad entre los resultados, obteniéndose un valor de 0.96. Por tanto, ambas metodologías son reproducibles entre sí y proporcionan resultados equivalentes.

II. INTRODUCCIÓN

La cocaína es un alcaloide que se encuentra en las hojas de la coca (*Erythroxylon coca*), planta originaria de Sudamérica (Katzung, 2007, p.537). Tiene restringidas aplicaciones terapéuticas como anestésico local, ya que es un estimulante poderosamente adictivo y su uso se asocia a una elevada toxicidad orgánica. Por esta razón, su manejo está sometido a fiscalización nacional e internacional (Ladrón y Moya, 1995, p.605).

En las últimas décadas ha aumentado la producción, distribución y comercialización ilícita de cocaína a nivel mundial (Embajada de los Estados Unidos de América, Sección de Asuntos Narcóticos.). Guatemala, por su ubicación geográfica, sus características geomorfológicas, factores socioeconómicos y culturales, se ha convertido en una de las principales rutas para el tráfico ilícito de la droga. Actualmente, el país es utilizado para almacenar y consolidar envíos desde el país productor hacia el país o los países consumidores (Naciones Unidas. Oficina Contra la Droga y el Delito [UNODC], 2007).

De conformidad con el Artículo 1º de la Ley contra la Narcoactividad (Congreso de la República de Guatemala, 1992), el Estado debe adoptar las medidas necesarias para sancionar toda actividad relacionada con la producción, fabricación, uso, tenencia, tráfico y comercialización de estupefacientes, psicotrópicos y demás drogas y fármacos -incluidos en convenios y tratados internacionales ratificados por Guatemala- cuyo uso es capaz de provocar dependencia física o psíquica.

Sin embargo, para que la ley sea de utilidad y genere fortalecimiento de la justicia, deben existir elementos probatorios confiables. Dichos elementos son esencialmente, aquellos que se basan en la investigación científica forense. El Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala -INACIF- en la Sección de Sustancias Controladas, lleva a cabo el análisis de drogas ilícitas y sustancias controladas -de acuerdo a convenios, leyes, códigos y normativas que rigen a nivel nacional e internacional-, emitiendo como

consecuencia los dictámenes técnico-científicos, con resultados y conclusiones que son fundamentales tanto para el proceso de acusación como para la administración de justicia.

La cocaína figura dentro de las sustancias controladas que generan un alto porcentaje de los análisis que se llevan a cabo en el Laboratorio de la Sección de Sustancias Controladas. Según lo consta la Memoria de Labores del INACIF correspondiente al año 2009, se realizaron en este período 10,389 análisis para la determinación de cocaína, constituyendo el 70.29% de la cantidad total de solicitudes y diligencias atendidas por dicha Sección (Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala [INACIF], 2009, pp. 27-28). Así también, la Memoria de Labores del INACIF correspondiente al año 2010, indica que se realizaron 4,404 análisis para la determinación de cocaína, constituyendo el 48.0% de la cantidad de solicitudes y diligencias atendidas durante este periodo (INACIF, 2010, pp. 42-43).

Para el análisis cualitativo de cocaína, el INACIF realiza procedimientos presuntivos y confirmatorios que permiten emitir un dictamen que confirme o descarte la presencia de la droga. El análisis presuntivo incluye pruebas de precipitación y color y el empleo de espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS). El análisis confirmatorio involucra el empleo de tecnología de altísima confiabilidad, pues se lleva a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) (INACIF, 2008). Cabe destacar que se ha considerado determinante el uso de esta última metodología para la confirmación de la presencia de la droga. La técnica es avalada por la Comunidad Forense Internacional, y la considera de alta importancia como sustento a cualquier afirmación. Asimismo, es empleada en laboratorios forenses reconocidos en países con vasta experiencia y desarrollo forense.

El sistema GC/MS da certeza de la presencia de cocaína y adicionalmente puede emplearse para cuantificar la concentración de la sustancia (Moffat, Osselton, & Widdop, 2004). Este aspecto permite en función de las necesidades institucionales, determinar la pureza de la droga, tal como lo establece la Ley contra la Narcoactividad. Por estas razones,

dicha técnica se utiliza en el INACIF para llevar a cabo el análisis cuantitativo de cocaína, cuando la determinación de la pureza de la droga es requerida por autoridad competente, dado que el Instituto no actúa de oficio.

Debido a la importancia legal que implica cada dictamen emitido por el personal pericial del Laboratorio de la Sección de Sustancias Controladas del Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala -INACIF-, la institución debe contar con metodologías confiables para la cuantificación de cocaína y otras sustancias que allí se analicen. Estas técnicas deben cumplir con los requisitos de desempeño necesarios para que los resultados de los análisis den certeza al sistema de justicia del país.

En virtud de lo anterior, se seleccionó la espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) como técnica alterna para llevar a cabo el análisis cuantitativo de cocaína. El sistema UV/VIS es rápido, económico, adicional a ser por naturaleza, un procedimiento muy utilizado para cuantificar. Por lo tanto, se evaluó si puede reproducir los mismos resultados que los obtenidos por el sistema de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), por medio del grado de reproducibilidad ó línea de concordancia de las mediciones entre ambas técnicas. No obstante, para llevar a cabo la comparación, fue necesario verificar previamente que la metodología es apta para llevar a cabo el análisis cuantitativo de la droga, por lo que se verificó que tanto el sistema GC/MS como UV/VIS demuestran la linealidad, exactitud y precisión (en términos de repetibilidad) necesarias para dicho análisis.

A partir de los resultados obtenidos, se procedió a evaluar estadísticamente si las metodologías son congruentes y comparables entre sí, así como a determinar alcances y limitantes de cada una de ellas.

III. ANTECEDENTES

A. Análisis de cocaína en la Sección de Sustancias Controladas del Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala -INACIF-

El Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala -INACIF-, en la Sección de Sustancias Controladas, lleva a cabo el análisis de cocaína que ha sido incautada por las fuerzas policiales bajo la dirección de la Fiscalía contra la Narcoactividad.

Para la identificación de la droga, el INACIF cuenta con el procedimiento de trabajo PRO-DTC-LAB-009 titulado “Análisis Cualitativo de Cocaína”, el cual reúne la información necesaria para la detección de cocaína en muestras que cumplen con el modelo de tráfico y que son recibidas en el Laboratorio de la Sección de Sustancias Controladas. Dicho procedimiento identificativo incluye pruebas de precipitación y color -cuya interpretación integral se refuerza con la experiencia pericial- y análisis instrumental por medio de espectrofotometría ultravioleta visible (UV/VIS) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) (INACIF, 2008). Esta última técnica es altamente confiable -aceptada y avalada por la Comunidad Forense Internacional-, y permite la identificación y confirmación de la presencia de cocaína. Actualmente, también es la técnica que se emplea en el INACIF para el análisis cuantitativo de esta sustancia, cuando por requerimiento de autoridad competente es necesaria la determinación de su pureza.

B. Estudios relacionados

Se conoce estudio realizado por Chen González, E., titulado “Validación del Método de Cromatografía de Gases para Cuantificar la Pureza de Cocaína”, en el cual se presenta la fase básica de cuantificación sin llegar a confirmar repetibilidad y reproducibilidad con la confiabilidad que el medio forense requiere. El método evaluado demostró ser lineal, exacto, preciso y específico; no obstante no se emplearon estándares comerciales o altamente calificados para la realización del ensayo (Chen, 1999).

La revisión de literatura no refiere que se hayan realizado estudios específicos sobre la cuantificación de cocaína mediante espectrofotometría ultravioleta/visible en Guatemala. En el plano internacional, Bonilla, D. y colaboradores presentaron recientemente en Medellín, Colombia, un estudio titulado “DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA PARA LA DETERMINACIÓN DE COCAÍNA EN UN POLÍMERO SINTÉTICO” en el que se emplea esta técnica para el análisis cuantitativo de cocaína en un polímero de látex utilizado comúnmente por ser precisa, lineal, robusta y selectiva frente a los componentes de la matriz, además de que resultó sencilla en su realización sin incurrir en costos excesivos y permitió la rápida entrega de resultados por parte de los peritos forenses. El estudio hace énfasis en la necesidad de proceder a ensayos previos por cromatografía en capa delgada para detectar sustancias que se utilizan a veces para rebajar y adulterar cocaína, ya que si estas sustancias, como por ejemplo, lidocaína, procaína o fenacetina, llegarán a ser detectadas, se debe determinar el contenido de cocaína por una metodología selectiva frente a estos contaminantes (Bonilla, Peñuela, Sierra, Díaz, y Rojas, 2008).

El análisis minucioso del contenido del trabajo “DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA PARA LA DETERMINACIÓN DE COCAÍNA EN UN POLÍMERO SINTÉTICO”, hace reflexionar sobre la importancia que se da a la no posibilidad de cuantificar con espectrofotometría ultravioleta/visible cocaína que contenga adulterantes.

Aún no existen estudios que comparen los resultados del análisis cuantitativo de cocaína utilizando el método de espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) versus cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), de igual manera se establece la poca información con respecto a la preparación de estándares a distintas concentraciones que se destinen al análisis cuantitativo por medio de espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS).

IV. JUSTIFICACIÓN

Se entiende por “sustancias controladas” aquellos productos que se encuentran incluidos en listados internacionales de productos que generan dependencia física y/o psíquica o son utilizados para la elaboración de los mismos (Puerto Rico. Asamblea Legislativa de Puerto Rico).

El Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala -INACIF-, por medio de peritos de la Sección de Sustancias Controladas, lleva a cabo el análisis de aquellas sustancias sometidas por autoridad competente, sospechosas de ser sustancias controladas y emite el dictamen técnico-científico correspondiente (INACIF, 2009, p. 27).

Actualmente, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), es la técnica instrumental que se utiliza en el Laboratorio de Sustancias Controladas para realizar la determinación de la pureza de cocaína incautada en el país. Tomando en cuenta que esta droga representa un porcentaje considerable de los análisis que se llevan a cabo, es indispensable que se disponga de metodologías analíticas diversas que proporcionen certeza analítica y jurídica, adicional a poderse constituir como metodologías alternas en caso de presentarse dificultades con los equipos que permiten la realización de las técnicas primarias establecidas. Lo anterior aunado a la necesidad de agilizar tiempos de respuesta, disminuir costos y mejorar el índice de confiabilidad técnica.

De conformidad con lo anterior y en base a investigación que señala la fortaleza que representa el empleo de la espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) en análisis cuantitativos, se seleccionó esta metodología que, aunque tiene la desventaja de no poder separar todos los elementos presentes en las sustancias incautadas -como lo hace la cromatografía de gases-, tiene la ventaja de ser una técnica específica para cuantificar (Skoog y otros, 2001, pp. 366-370). Por esta razón, podría utilizarse para el análisis cuantitativo de cocaína, siempre y cuando no se detecten previamente adulterantes que podrían generar resultados no valederos.

V. OBJETIVOS

A. GENERALES

1. Contribuir con la selección de metodologías alternas para los procedimientos que el INACIF realiza en el análisis de drogas de abuso.
2. Comparar los resultados de la cuantificación de cocaína sometida a análisis por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

B. ESPECÍFICOS

1. Establecer el rango de concentración útil para optimizar el empleo de la espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS); aspecto básico en el desarrollo de la investigación.
2. Determinar la linealidad, exactitud y precisión del método de cuantificación de cocaína por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS).
3. Determinar la linealidad, exactitud y precisión del método de cuantificación de cocaína por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).
4. Determinar si los resultados de la cuantificación de cocaína entre el método UV/VIS y el sistema GC/MS son reproducibles y equivalentes entre sí.
5. Determinar si la espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) puede emplearse como metodología alterna a la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) para llevar a cabo la cuantificación de cocaína, en muestras que no contengan adulterantes.

VI. HIPÓTESIS

Los resultados obtenidos por el método de espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) son equivalentes a los resultados obtenidos por el método de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) en la cuantificación de cocaína sin adulterantes sometida a análisis en el Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala -INACIF-.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO DE TRABAJO Y MUESTRA

Las metodologías evaluadas fueron la espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Para realizar la comparación y la determinación de concordancia entre ellas, se analizaron un total de quince (15) muestras de cocaína de diferente pureza por ambas metodologías.

B. MEDIOS

1. Recursos Humanos

- a. Autora: Br. Rita María Miranda Ovalle
- b. Asesora: Licda. Miriam Dolores Ovalle Gutiérrez de Monroy
- c. Colaboración de peritos profesionales del INACIF

2. Material y Equipo:

a) **Materiales**

- i. Celdas rectangulares de cuarzo para lectura espectrofotométrica en región ultravioleta/visible con capacidad de 3 mL
- ii. Viales de vidrio con capacidad de 2 mL
- iii. Insertos de polipropileno con capacidad de 200 μ L
- iv. Arandelas de 11 mm de diámetro con septa de teflón rojo
- v. Pipetas volumétricas de volumen variable con capacidad de medición de 10-100 y 100-1000 μ L
- vi. Puntas de plástico compatibles con pipetas de volumen variable
- vii. Encapsulador manual especial para arandelas de 11 mm de diámetro
- viii. Desencapsulador manual para arandelas de 11 mm de diámetro
- ix. Viales cónicos para evaporación
- x. Agitador vórtex

- xi. Baño ultrasonido
- xii. Balones aforados con capacidad de 10 mL y 100 mL
- xiii. Beakers de distinta capacidad
- xiv. Espátulas de acero inoxidable
- xv. Guantes de látex

b) Equipo

- i. Espectrofotómetro de luz ultravioleta/visible con detector de arreglo de diodos marca Hewlett-Packard modelo HP8453 y su Software.
- ii. Cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 7890 provisto de automuestreador (ALS) acoplado a espectrómetro de masas marca Agilent modelo 5975C, y su software.
- iii. Balanza analítica

3. Reactivos y soluciones de trabajo

- a. Estándares de referencia de cocaína [1mg/mL] marca Cerilliant® (99.0% de pureza)
- b. Estándares de referencia de cocaína-D₃ [1mg/mL], marca Cerilliant® (99.0% de pureza)
- c. Metanol grado cromatográfico
- d. Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0.5 N
- e. Acetona grado cromatográfico
- f. Acetato de etilo grado cromatográfico

C. PROCEDIMIENTO

El estudio se llevó a cabo en tres fases. En primer lugar, se desarrolló un método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) para la cuantificación de cocaína y se evaluó la linealidad, la exactitud y la precisión en términos de repetibilidad. En la segunda fase del estudio, se procedió a desarrollar un método por cromatografía de

gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), en un rango de concentración idéntico al empleado en el método por UV/VIS. De igual manera, se evaluó la linealidad, la exactitud y la precisión del método.

Finalmente, se procedió a comparar la reproducibilidad y concordancia entre ambos métodos desarrollados, mediante la cuantificación de quince muestras de cocaína de diferente pureza.

1. FASE I: Desarrollo y evaluación del método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) para la cuantificación de cocaína

a) Condiciones de operación del equipo

El espectrofotómetro ultravioleta/visible se operó en la región ultravioleta con las siguientes condiciones:

Cuadro 1. Condiciones de operación del espectrofotómetro ultravioleta/visible (UV/VIS)

MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTÓMETRO	
Acquisition range	190 to 11000 nm
Interval	1 nm
Integration time	0.5 s
Std. Deviation	On
Parámetros de cuantificación	
Wavelengths	
Used Wavelengths	233 nm
Background correction	None
Calibration	
Analyte name	Cocaína
Calibration curve type	Linear offset
Enter concentration	
Concentration	µg/mL Unit
Data Analysis	
Data type	Absorbance
Display spectrum	200-360 nm

b) Evaluación de linealidad

Para la evaluación de linealidad, se preparó una curva de calibración que consta de seis puntos en un rango de concentración de 5 µg/mL a 30 µg/mL, lo que corresponde del 25% al 125% de la concentración esperada de cocaína en las muestras a ser cuantificadas.

i. Preparación de la curva de calibración para la evaluación de linealidad:

En seis balones aforados de 10 mL, conteniendo aproximadamente 5 mL de Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 0.5 N, se añadió el estándar de referencia de cocaína [1 mg/mL], de acuerdo a lo especificado a continuación:

Cuadro 2. Preparación de la curva de calibración mediante espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS)

Nombre	Concentración nominal* (µg/mL)	Estándar de referencia cocaína [1 mg/mL] (µL)
Calibrador 1	05	50
Calibrador 2	10	100
Calibrador 3	15	150
Calibrador 4	20	200
Calibrador 5	25	250
Calibrador 6	30	300

(*): Se realizaron las correcciones pertinentes en base a la pureza del estándar de cocaína.

Cuando fueron agregados los volúmenes especificados, se añadió Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 0.5 N hasta el aforo. Luego se cerró cada uno de los balones aforados con su respectivo tapón para evitar evaporación.

Adicionalmente, se preparó un balón aforado conteniendo Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 0.5 N, para ser empleado como blanco solvente.

ii. Lectura de la curva de calibración:

Se añadió aproximadamente 3 mL de cada una de las soluciones preparadas en las celdas de cuarzo para lectura espectrofotométrica. Las soluciones fueron colocadas en el carrusel del equipo iniciando con el blanco solvente, seguido del calibrador de menor concentración hasta el calibrador de mayor concentración. Cada concentración fue leída por triplicado.

Previo a elaborar la curva de calibración en el equipo, fue necesario verificar los siguientes criterios:

- El blanco solvente no debía presentar absorbancia en el espectro.
- La máxima absorción de los espectros obtenidos de cada calibrador debía encontrarse a $233 \text{ nm} \pm 2\text{nm}$ (Council of Europe, 2001, p. 6).

iii. Elaboración de la curva de calibración en el software del equipo:

Después de que la secuencia fue analizada, se procedió a elaborar la curva de calibración en el software “*HP ChemStation for UV-Visible Spectroscopy*” incorporado en el equipo.

c) Evaluación de exactitud

Para evaluar este parámetro, se prepararon por duplicado soluciones de trabajo a tres concentraciones distintas: baja (5 $\mu\text{g/mL}$), media (15 $\mu\text{g/mL}$) y alta (30 $\mu\text{g/mL}$), a partir de un estándar de referencia de Cocaína [1 mg/mL].

i. Preparación de soluciones de trabajo para la verificación de exactitud:

En seis balones aforados de 10 ml con sus respectivos tapones se añadieron los volúmenes de estándar de referencia que se especifican a continuación:

Cuadro 3. Preparación estándares de trabajo de cocaína para la evaluación de exactitud

Nombre	Concentración nominal* (µg/mL)	Estándar de referencia cocaína [1 mg/mL] (µL)
Estándar 1	05	50
Estándar 2	05	50
Estándar 3	15	150
Estándar 4	15	150
Estándar 5	30	300
Estándar 6	30	300

(*): Las correcciones se realizaron en base a la pureza del estándar de referencia.

Cuando fueron agregados los volúmenes especificados, se añadió Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 0.5 N hasta el aforo. Luego se cerró cada uno de los balones aforados con su respectivo tapón para evitar evaporación.

Adicionalmente, se preparó un balón aforado conteniendo Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 0.5 N, para ser empleado como blanco.

Cada solución de trabajo fue analizada en el equipo por sextuplicado a 233 nm.

d) Evaluación de precisión

Para la evaluación de precisión en términos de repetibilidad, se prepararon seis soluciones de trabajo al 100% de la concentración esperada, a partir de un estándar de referencia de cocaína [1 mg/mL].

i. Preparación de soluciones de trabajo:

En seis balones aforados de 10 mL con sus respectivos tapones se añadieron los volúmenes de estándar de referencia que se especifican a continuación:

Cuadro 4. Preparación estándares de trabajo de cocaína para la evaluación de precisión

Nombre	Concentración nominal* ($\mu\text{g/mL}$)	Estándar de referencia cocaína [1 mg/mL] (μL)
Estándar 1	20	200
Estándar 2	20	200
Estándar 3	20	200
Estándar 4	20	200
Estándar 5	20	200
Estándar 6	20	200

(*): Las correcciones se realizaron en base a la pureza del estándar de referencia.

Cuando fueron agregados los volúmenes especificados, se añadió (H_2SO_4) 0.5 N hasta el aforo. Luego se cerró cada uno de los balones aforados con su respectivo tapón para evitar evaporación.

Adicionalmente, se preparó un balón aforado conteniendo Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 0.5 N, para ser empleado como blanco.

Fueron analizadas 10 réplicas de cada solución preparada. Las lecturas se realizaron a 233 nm.

2. FASE II: Desarrollo y evaluación del método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la cuantificación de cocaína

a. Condiciones de operación del equipo

El cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas se operó con las siguientes condiciones:

Cuadro 5. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas

MÉTODO HP 7890	
HORNO	
Equilibration Time:	0.5 min
Oven Program:	180°C for 0 min, then 15°C/min to 280°C for 3 min.
Run Time:	9.6667 min
INYECTOR FRONTAL	
Injection Volume:	0.2 µl
Mode:	Splitless
Heater:	On 220 °C
MSD Transfer Line	280 °C
COLUMNA	
Columna alta resolución HP-5MS (5% -fenil-metilpolisiloxano) de 30 metros de longitud, 0.25mm de diámetro interno (narrow bore) y recubrimiento de 0.25 µm.	
MS Acquisition Parameters	
Acquisition Mode:	SIM
Solvent Delay:	3.00 min
SIM PARAMETERS	
Group ID:	1
Resolution:	High
Plot Ion:	82.00
Ions/Dwell in Group	(Mass, Dwell) / (82.00, 100)
	(Mass, Dwell) / (182.00, 100)
	(Mass, Dwell) / (303.00, 100)
	(Mass, Dwell) / (85.00, 100)
	(Mass, Dwell) / (185.00, 100)
	(Mass, Dwell) / (306.00, 100)

b. Evaluación de linealidad

Para evaluar la linealidad se preparó una curva de calibración que consta de seis puntos en un rango de concentración de 5 µg/ml a 30 µg/ml, lo que corresponde del 25% al 125% de la concentración esperada de cocaína en las muestras a ser cuantificadas.

La curva de calibración se preparó empleando el método del estándar interno. El estándar interno es una sustancia que se añade tanto a los calibradores, estándares y muestras a ser cuantificadas, a una concentración constante y conocida. Sus características físicas y químicas, deben ser similares al analito que se está cuantificando y su adición no debe causar ningún tipo de interferencia en el análisis. Por esta razón, se seleccionó cocaína-D₃ como estándar interno para llevar a cabo el análisis cuantitativo de cocaína por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

i. Preparación de solución stock (estándar de referencia, cocaína 50 µg/mL):

Se tomaron 50 µL de una ampolla de cocaína (1mg/ml) y se transfirió a vial cónico. Se evaporó a sequedad y posteriormente, se reconstituyó con 1 mL de metanol grado cromatográfico.

ii. Preparación de solución stock (estándar de referencia, cocaína-D₃ 100 µg/mL):

Se tomaron 100 µL de una ampolla de cocaína-D₃ (1mg/ml) y se transfirió a vial cónico. Se evaporó a sequedad y posteriormente, se reconstituyó con 1 mL de metanol grado cromatográfico.

iii. Preparación de curva de calibración para la evaluación de linealidad:

Para la preparación de los distintos calibradores y controles negativos se adicionaron en viales de vidrio de 2 mL con sus respectivos insertos polipropileno, los volúmenes que se especifican a continuación:

Cuadro 6. Preparación de la curva de calibración por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Nombre	Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)*	Volumen necesario para completar 200 μL		
		Solución stock de cocaína- D_3 **	Metanol GC	Solución stock de cocaína
BLK	Blanco Solvente	----	200	----
BLKISTD	Blanco ISTD	40	160	----
Calibrador 1	05	40	140	20
Calibrador 2	10	40	120	40
Calibrador 3	15	40	100	60
Calibrador 4	20	40	80	80
Calibrador 5	25	40	60	100
Calibrador 6	30	40	40	120

(*): Las correcciones se realizaron en base a la pureza del estándar de referencia.

(**): El estándar de cocaína- D_3 se encuentra a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ (punto medio de la curva de calibración).

Cuando fueron agregados la totalidad de los volúmenes, se taparon y sellaron los viales con arandelas de aluminio para evitar evaporación. Se procedió a inyectar cada concentración en el equipo por triplicado.

iv. Inyección de curva de calibración:

Se ingresó la secuencia en el equipo iniciando con el blanco solvente, blanco estándar interno, seguido del calibrador de menor concentración hasta el calibrador de mayor concentración. Los viales se colocaron de conformidad con la secuencia ingresada.

Previo a elaborar la curva de calibración en el equipo, fue necesario verificar los siguientes criterios:

- El cromatograma del blanco solvente no debía presentar contaminación alguna.

- En el cromatograma del blanco estándar interno debía aparecer el espectro de masas correspondiente, en el tiempo de retención esperado.
- En los cromatogramas de cada uno de los calibradores, debían aparecer en el tiempo de retención esperado, tanto el espectro del estándar interno (cocaína-D₃) como el espectro de cocaína.
- Las respuestas de cocaína-D₃ debían ser similares en los distintos calibradores.

v. Elaboración de la curva de calibración mediante el software del equipo:

Después de que la secuencia fue analizada se procedió a elaborar la curva de calibración en el equipo mediante el software “*Agilent MSD Productivity ChemStation for GC and GC/MS Systems*” incorporado en el equipo.

c. Evaluación de exactitud

Para evaluar la exactitud se prepararon por duplicado soluciones de trabajo a tres concentraciones distintas: baja (5 µg/mL), media (15µg/mL) y alta (30 µg/mL).

i. Preparación de solución stock (estándar de cocaína, 50µg/mL):

Se tomaron 50 µL de una ampolla de cocaína (1mg/ml) y se transfirió a vial cónico. Se evaporó a sequedad y reconstituyó con 1 mL de metanol grado cromatográfico.

ii. Preparación de solución stock (estándar de cocaína-D₃, 100 µg/mL):

Se tomaron 100 µL de una ampolla de cocaína-D₃ (1mg/ml) y se transfirió a vial cónico. Se evaporó a sequedad y posteriormente se reconstituyó con 1 mL de metanol grado cromatográfico.

iii. Preparación de soluciones de trabajo para la verificación de exactitud:

Para la preparación de las soluciones de trabajo se adicionaron a seis viales de vidrio de 2 mL con sus respectivos insertos polipropileno, los volúmenes que se especifican a continuación:

Cuadro 7. Preparación estándares de trabajo de cocaína para la evaluación de exactitud

Nombre	Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)*	Volumen necesario para completar 200 μL		
		Solución stock de cocaína- D_3 **	Metanol GC	Solución stock de cocaína
Estándar 1	05	40	140	20
Estándar 2	05	40	140	20
Estándar 3	15	40	100	60
Estándar 4	15	40	100	60
Estándar 5	30	40	40	120
Estándar 6	30	40	40	120

(*): Las correcciones se realizaron en base a la pureza del estándar de referencia.

(**): El estándar de cocaína- D_3 se encuentra a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ (punto medio de la curva de calibración).

Cuando fueron agregados la totalidad de los volúmenes, se taparon y sellaron los viales con arandelas de aluminio para evitar evaporación. Se procedió a inyectar cada concentración en el equipo por sextuplicado.

d. Evaluación de precisión

Para evaluar la precisión en términos de repetibilidad se prepararon seis soluciones de trabajo al 100% de la concentración esperada de cocaína en las muestras a cuantificar.

i. Solución stock (estándar de referencia, cocaína, 50 µg/mL):

Se tomaron 50 µL de una ampolla de cocaína (1mg/ml) y se transfirió a vial cónico. Se evaporó a sequedad y posteriormente, se reconstituyó con 1 mL de metanol grado cromatográfico.

ii. Solución stock (estándar de referencia, cocaína-D₃ 100 µg/mL):

Se tomaron 100 µL de una ampolla de cocaína-D₃ (1mg/ml) y se transfirió a vial cónico. Se evaporó a sequedad y posteriormente, se reconstituyó con 1 mL de metanol grado cromatográfico

iii. Preparación de soluciones de trabajo para verificación de precisión:

Para la preparación de las soluciones de trabajo se adicionaron a seis viales de vidrio de 2 mL con sus respectivos insertos polipropileno, los volúmenes que se especifican a continuación:

Cuadro 8. Preparación estándares de trabajo de cocaína para la evaluación de repetibilidad

Nombre	Concentración nominal (µg/mL)*	Volumen necesario para completar 200 µL		
		Solución stock de cocaína-D ₃ **	Metanol GC	Solución stock de cocaína
Estándar 1	20	40	80	80
Estándar 2	20	40	80	80
Estándar 3	20	40	80	80
Estándar 4	20	40	80	80
Estándar 5	20	40	80	80
Estándar 6	20	40	80	80

(*): Las correcciones se realizaron en base a la pureza del estándar de referencia

(**): El estándar de cocaína-D₃ se encuentra a una concentración de 20 µg/mL (punto medio de la curva de calibración).

Cuando fueron agregados la totalidad de los volúmenes, se taparon y sellaron los viales con arandelas de aluminio para evitar evaporación. Se programó el equipo a modo de que cada solución se inyectará 10 veces.

3. FASE III: Determinación de reproducibilidad y concordancia entre el método por GC/MS y el método por UV/VIS para la cuantificación de cocaína

Se prepararon 15 soluciones de cocaína de diferente pureza y posteriormente se cuantificaron por ambos métodos con el objeto de determinar la reproducibilidad y concordancia.

a. Preparación de solución madre, cocaína [200 µg/mL]:

- i. Se pesaron exactamente 20.00 mg de cocaína utilizando balanza analítica y se transfirieron cuantitativamente a balón aforado de 100 mL.
- ii. Se agregó Metanol grado cromatográfico hasta el aforo

b. Cuantificación de cocaína empleando el método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS)

- i. Se tomó 1.0 mL de la solución madre de cocaína [200 µg/mL] y se transfirió a balón aforado de 10 mL.
- ii. Se agregó Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 0.5 N hasta el aforo y luego de esto, se agitó en vórtex.
- iii. Cada muestra se analizó por triplicado en el equipo a 233 nm.

c. Cuantificación de cocaína empleando el método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

- i. Se tomó un volumen de 20 µL de la solución madre de cocaína [200 µg/mL] y se transfirió a inserto de polipropileno colocado en vial de vidrio con capacidad de 2 mL.
- ii. Se agregaron 40 µL de cocaína- D_3 [100 µg/mL] y 140 µL de metanol grado cromatográfico para completar un volumen total de 200 µL.
- iii. El vial de de vidrio preparado se tapó y selló con arandela de aluminio, para evitar evaporación.
- iv. Se programó el equipo a modo que cada solución se inyectara en el equipo por triplicado.

d. Cálculo del porcentaje de pureza:

- i. La pureza de cocaína para el método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/V) se calculó a través de las siguientes fórmulas:

$$\text{Concentración experimental Cocaína base} = \text{Resultado de la cuantificación } (\mu\text{g/mL}) * \left\{ \frac{\text{Peso molecular cocaína base}}{\text{Peso molecular cocaína HCl}} \right\}$$

$$\text{Porcentaje de pureza} = \frac{\text{Concentración experimental cocaína base } (\mu\text{g/mL})}{\text{Concentración teórica de la muestra } (\mu\text{g/mL})}$$

- ii. La pureza de cocaína para el método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de pureza} = \frac{\text{Concentración experimental cocaína } (\mu\text{g/mL})}{\text{Concentración teórica de la muestra } (\mu\text{g/mL})}$$

D. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1. Linealidad:

Se determinó construyendo una curva de calibración utilizando 6 puntos que abarcaban del 25% al 125% de la concentración esperada. La verificación de la linealidad de la gráfica de calibración se realizó con la herramienta de regresión lineal, que generó una ecuación de la forma ($y = bx + a$) donde b corresponde a la pendiente y a al intercepto en el eje y.

La linealidad se evaluó con los criterios de aceptación detallados en el siguiente cuadro:

Cuadro 9. Criterios de aceptación para la evaluación de linealidad

Parámetro estadístico evaluado	Criterio
r = Coeficiente de correlación	0.98-1.00
r^2 = Coeficiente de determinación	≥ 0.98
CV_f = Coeficiente de variación del factor respuesta	$< 5.0\%$
Valor p de regresión	< 0.05
Valor F calculado en el análisis de varianza	$F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$

2. **Exactitud:**

Se evaluó a través del análisis de soluciones enriquecidas a tres niveles de concentración (25%, 50% y 100%).

El análisis estadístico incluyó la valoración del porcentaje de recuperación global y una prueba t de Student. Los criterios de aceptación bajo los cuales se evaluó la exactitud se detallan en el siguiente cuadro:

Cuadro 10. Criterios de aceptación para la evaluación de exactitud

Parámetro estadístico evaluado	Criterio de aceptación
Promedio aritmético del porcentaje de recobro	(95.0-105.0)%
Intervalo de confianza (nivel de confianza 95.0%)	Incluye el 100.0%
Test de Student ($\alpha = 0.05$; $gl = 34$)	$t_{\text{calculada}} < t_{\text{tabulada}}$
Valor p para el test de Student	> 0.05
Coeficiente de variación entre réplicas	< 2.0

a) Prueba de hipótesis:

Utilizando los valores derivados del porcentaje de recuperación en los distintos niveles de concentración se comprobó la siguiente hipótesis:

Ho: $\mu=100\%$

Ha: $\mu\neq 100\%$

Si no hay diferencia significativa en el porcentaje de recuperación encontrado con el esperado (100%) se espera no rechazar Ho.

3. Repetibilidad:

Se evaluaron 6 soluciones patrón de cocaína a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ cada (100% de la concentración esperada), preparadas a partir de estándares de referencia de cocaína.

Con los valores obtenidos se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV%) global para cada metodología. Los criterios de aceptación bajo los cuales se evaluó la precisión se detallan en el siguiente cuadro:

Cuadro 11. Criterios de aceptación para la evaluación de repetibilidad

Parámetro estadístico evaluado	Criterio de aceptación
Coeficiente de variación entre réplicas (%)	< 2.0 %
Coeficiente de variación global (%)	< 2.0 %

4. Reproducibilidad y equivalencia entre metodologías:

Se utilizó un diseño de investigación pareado, ya que las muestras que se emplearon para la evaluación del parámetro analítico se sometieron a análisis por las dos metodologías en estudio.

La reproducibilidad (concordancia) entre metodologías se midió por medio del coeficiente de correlación de concordancia de Lin, empleando los resultados derivados del análisis cuantitativo. El coeficiente de correlación de concordancia se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$r_c = \frac{S_1^2 + S_2^2 - S_{(1-2)}^2}{S_1^2 + S_2^2 + (\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2)^2}$$

Donde S_1 y S_2 son las varianzas de cada método, \bar{Y}_1 y \bar{Y}_2 son las medias de cada método y $S_{(1-2)}$ equivale a la varianza de las diferencias entre las mediciones del método 1 y método 2. ^(16,17)

Para la interpretación del coeficiente de correlación de concordancia de Lin, se han sugerido los valores del siguiente cuadro para valorar el grado de concordancia entre mediciones:

Cuadro 12. Grado de concordancia según valor del Coeficiente de correlación de concordancia de Lin

r_c	Valoración
0.99	Perfecta concordancia
0.95-0.99	Concordancia sustancial
0.90-0.95	Concordancia moderada
0.90	Concordancia pobre

Fuente: (National Institute of Water & Atmospheric Research [NIWA], 2009)

a) Prueba de hipótesis:

Se realizó una prueba t de Student para medias de dos muestras emparejadas, para medir la equivalencia entre la metodología por cromatografía (M_1) y el método espectrofotométrico (M_2). Se comprobó la siguiente hipótesis:

$$H_0: \bar{d} = 0$$

$$H_a: \bar{d} \neq 0$$

En donde \bar{d} es la diferencia entre las respuestas entre M_1 y M_2 . Si hay igualdad entre metodologías, se espera no rechazar H_0 .

VIII. RESULTADOS

A. EVALUACIÓN DEL MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA/VISIBLE (UV/VIS) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COCAÍNA

1. Linealidad

Los resultados que se obtuvieron en la evaluación de linealidad del método desarrollado por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) se resumen en el siguiente cuadro y se detallan junto con su procesamiento estadístico en el Anexo A, cuadros 27, 28 y 29.

Cuadro 13. Resultados obtenidos en la evaluación de linealidad para el método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS)

Calibrador	Réplica	Concentración nominal (µg/mL)	Absorbancia (nm)
1	1	4.95	0.24086
	2	4.95	0.24063
	3	4.95	0.24089
2	1	9.90	0.48856
	2	9.90	0.48737
	3	9.90	0.48766
3	1	14.85	0.68088
	2	14.85	0.68059
	3	14.85	0.68056
4	1	19.80	0.88473
	2	19.80	0.88507
	3	19.80	0.88447
5	1	24.75	1.10810
	2	24.75	1.10800
	3	24.75	1.10770
6	1	29.70	1.33310
	2	29.70	1.33380
	3	29.70	1.33320
Ecuación de la recta: $y = 0.04345x + 0.0365$			

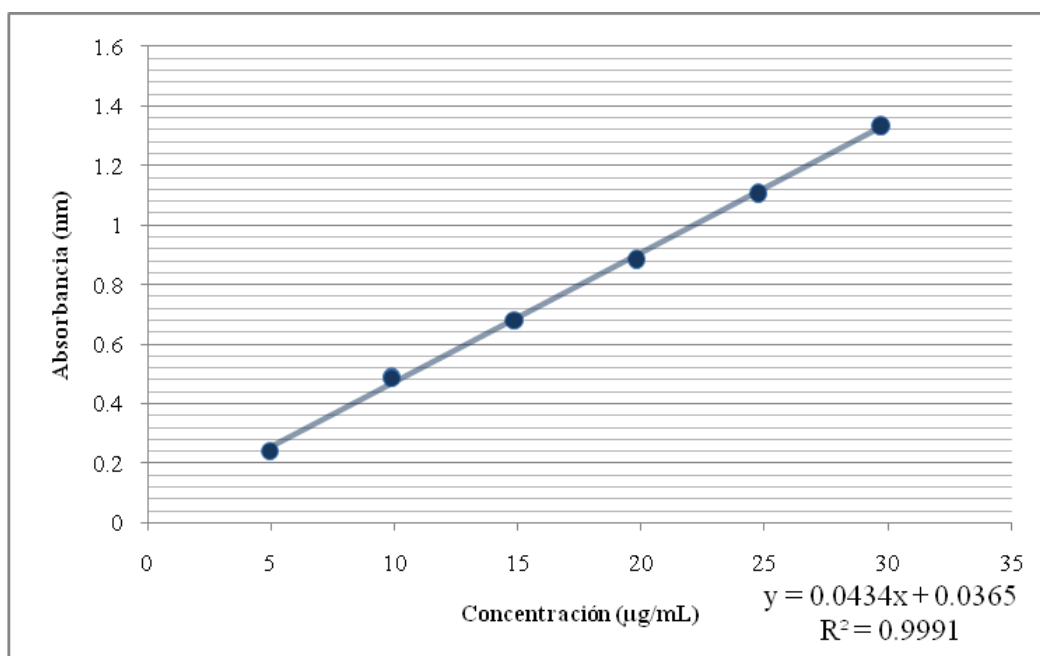
Fuente: Datos experimentales, obtenidos mediante pruebas analíticas.

Cuadro 14. Criterios evaluados para el análisis de linealidad del método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS)

Parámetro estadístico evaluado	Criterio de aceptación	Resultado	Cumple	
			SI	NO
Coefficiente de correlación de la regresión lineal	0.98-1.00	0.9995	x	
Coefficiente de determinación de la regresión lineal	≥ 0.98	0.9991	x	
Valor p en el análisis de regresión	< 0.05	< 0.00001	x	
Valor F calculado en el análisis de varianza (valor de significancia 95.0%)	$F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ $F_{\text{calculado}}: 4.49$	$F_{\text{calculado}}: 16828.2$	x	
Coefficiente de variación (CV%) para el factor de respuesta	$< 5.0\%$	0.23%	x	

Gráfico 1.

Curva de calibración (Concentración de cocaína versus Absorbancia)



Fuente: Datos experimentales, obtenidos mediante pruebas analíticas.

2. Evaluación de exactitud

Los resultados que se obtuvieron en la exactitud del método desarrollado por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) se resumen en el siguiente cuadro y se detallan junto con su procesamiento estadístico en el Anexo A, cuadros 30 y 31.

Cuadro 15. Resultados obtenidos en la evaluación de exactitud para el método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS)

No.	Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio aritmético		Coeficiente de variación (%)
		Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de recuperación (%)	
1	4.95	4.84	97.78	0.06
2	4.95	4.39	88.65	0.15
3	14.85	14.93	100.56	0.03
4	14.85	15.31	103.12	0.04
5	19.80	29.76	100.19	0.07
6	19.80	29.81	100.36	0.08

Fuente: Datos experimentales, obtenidos mediante pruebas analíticas.

Cuadro 16. Criterios evaluados para el análisis de exactitud del método por espectrofotometría ultravioleta visible (UV/VIS)

Parámetro estadístico evaluado	Criterio de aceptación	Resultado	Cumple	
			SI	NO
Promedio aritmético del porcentaje de recobro	(95.0-105.0)%	98.44	x	
Intervalo de confianza (nivel de confianza 95.0%)	Incluye el 100.0%	(96.85-100.04)%	x	
Test de Student ($\alpha = 0.05$; $gl = 34$)	$t_{\text{calculada}} < t_{\text{tabulada}}$ $t_{\text{tabulada}} = 2.03$	-1.9834	x	
Valor p para el test de Student	> 0.05	0.0548	x	

3. Evaluación de precisión

Los resultados que se obtuvieron en la evaluación de precisión en términos de repetibilidad para el método desarrollado por espectrofotometría ultravioleta/visible se resumen en la siguiente tabla y se detallan junto con su procesamiento estadístico en el Anexo A, cuadro 32.

Cuadro 17. Criterios evaluados para el análisis de repetibilidad del método por espectrofotometría ultravioleta/Visible (UV/VIS)

Parámetro	Patrón					
	1	2	3	4	5	6
Número de datos	10	10	10	10	10	10
Promedio (µg/mL)	19.55	19.61	19.26	20.06	20.00	19.54
S.D.*	0.0234	0.0102	0.0210	0.0164	0.0055	0.0065
Coefficiente de variación (%)	0.12	0.05	0.11	0.08	0.03	0.03
Coefficiente de variación global	1.43 %					

(*): S.D. = Desviación Estándar.

Fuente: Datos experimentales, obtenidos mediante pruebas analíticas.

Cuadro 18. Criterios evaluados para el análisis de repetibilidad del método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS)

Parámetro estadístico evaluado	Criterio de aceptación	Resultado	Cumple	
			SI	NO
Coefficiente de variación entre réplicas (%)	< 2.0 %	< 2.0 %	x	
Coefficiente de variación global (%)	< 2.0 %	1.43 %	x	

B. EVALUACIÓN DEL MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS)

1. Evaluación de linealidad

Los resultados que se obtuvieron en la evaluación de linealidad del método desarrollado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se resumen en el siguiente cuadro y se detallan junto con su procesamiento estadístico en el Anexo B, cuadros 33, 34 y 35.

Cuadro 19. Resultados obtenidos en la evaluación de linealidad para el método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

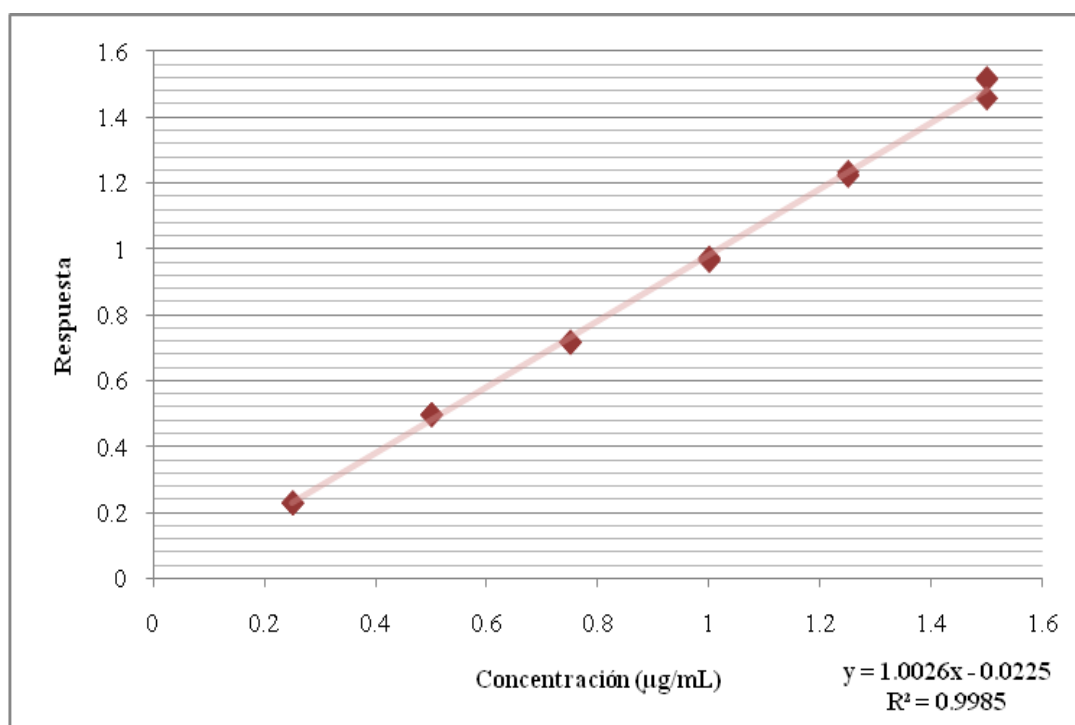
Calibrador	Réplica	Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Relación Cocaína/ Cocaína-D ₃	
			Concentración	Respuesta
1	1	4.95	0.25	0.227797955
	2	4.95	0.25	0.229636712
	3	4.95	0.25	0.227730953
2	1	9.90	0.50	0.495526743
	2	9.90	0.50	0.496124047
	3	9.90	0.50	0.496856088
3	1	14.85	0.75	0.717041023
	2	14.85	0.75	0.714213043
	3	14.85	0.75	0.716779349
4	1	19.80	1.00	0.963288022
	2	19.80	1.00	0.972177466
	3	19.80	1.00	0.967506425
5	1	24.75	1.25	1.222230278
	2	24.75	1.25	1.231880266
	3	24.75	1.25	1.221742182
6	1	29.70	1.50	1.455991598
	2	29.70	1.50	1.513044073
	3	29.70	1.50	1.516457223
Ecuación de la recta: $y = 1.0026x - 0.0225$				

Fuente: Datos experimentales, obtenidos mediante pruebas analíticas.

Cuadro 20. Criterios evaluados para el análisis de linealidad del método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

Parámetro estadístico evaluado	Criterio de aceptación	Resultado	Cumple	
			SI	NO
Coefficiente de correlación de la regresión lineal	0.98-1.00	0.9992	x	
Coefficiente de determinación de la regresión lineal	≥ 0.98	0.9985	x	
Valor p en el análisis de regresión	< 0.05	< 0.00001	x	
Coefficiente de variación (CV%) para el factor de respuesta	5.0%	3.09%	x	
Valor F calculado en el análisis de varianza	$F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ $F_{\text{calculado}}: 4.49$	$F_{\text{calculado}}: 10575.93$	x	

Gráfica 2. Curva de calibración (Relación concentraciones cocaína/cocaína-D₃ versus Relación de respuestas cocaína/cocaína-D₃)



Fuente: Datos experimentales, obtenidos mediante pruebas analíticas.

2. Evaluación de exactitud

Los resultados que se obtuvieron en la evaluación de exactitud del método desarrollado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) se resumen en el siguiente cuadro y se pueden observar junto con su procesamiento estadístico en el Anexo B, cuadros 36 y 37.

Cuadro 21. Resultados obtenidos en la evaluación de exactitud para el método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

No.	Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio aritmético		Coeficiente de variación (%)
		Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de recuperación (%)	
1	4.95	5.29	106.93	0.29
2	4.95	5.40	109.07	0.24
3	14.85	14.24	95.89	0.19
4	14.85	14.66	98.72	0.30
5	19.80	28.97	97.55	0.25
6	19.80	28.65	96.48	0.70

Fuente: Datos experimentales, obtenidos mediante pruebas analíticas.

Cuadro 22. Criterios evaluados para el análisis de exactitud del método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

Parámetro estadístico evaluado	Criterio de aceptación	Resultado	Cumple	
			SI	NO
Promedio aritmético del porcentaje de recobro	(95.0-105.0)%	100.7%	x	
Intervalo de confianza (nivel de confianza 95.0%)	Incluye el 100.0%	(98.98-102.57)%	x	
Test de Student ($\alpha = 0.05$; $gl = 34$)	$t_{\text{calculada}} < t_{\text{tabulada}}$ $t_{\text{tabulada}} = 2.03$	0.8739	x	
Valor p para el test de Student	> 0.05	0.3881	x	
Coeficiente de variación entre réplicas	< 2.0	< 2.0	x	

3. Evaluación de precisión

Los resultados que se obtuvieron en la evaluación de precisión en términos de repetibilidad para el método desarrollado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) se resumen en la siguiente tabla y se detallan junto con su procesamiento estadístico en el Anexo B, cuadro 38.

Cuadro 23. Resultados obtenidos en la evaluación de repetibilidad para el método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

Patrón	Resultados obtenidos					
	1	2	3	4	5	6
Número de datos	10	10	10	10	10	10
Promedio (µg/mL)	18.99	18.61	18.39	18.92	18.42	18.52
S.D.*	0.026	0.052	0.069	0.055	0.037	0.069
Coficiente de variación (%)	0.14	0.28	0.37	0.29	0.20	0.37
Coficiente de variación global	1.30%					

(*): S.D. = Desviación Estándar.

Fuente: Datos experimentales, obtenidos mediante pruebas analíticas.

Cuadro 24. Criterios evaluados para el análisis de repetibilidad del método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

Parámetro estadístico evaluado	Criterio de aceptación	Resultado	Cumple	
			SI	NO
Coficiente de variación entre réplicas (%)	< 2.0 %	< 2.0 %	x	
Coficiente de variación global (%)	< 2.0 %	1.30%	x	

C. DETERMINACIÓN DE REPRODUCIBILIDAD Y CONCORDANCIA ENTRE MÉTODOS

El análisis estadístico realizado se detalla en el Anexo C, cuadros 39 y 40.

Cuadro 25. Resultados de la determinación de pureza de quince (15) muestras de cocaína empleando GC/MS y UV/VIS

No. Muestra	Porcentaje de pureza de Cocaína (%)	
	GC/MS	UV/VIS
1	75.52	73.88
2	71.52	74.07
3	61.73	63.94
4	66.70	66.70
5	73.90	70.55
6	62.38	64.11
7	63.73	61.22
8	71.90	67.90
9	58.76	59.65
10	48.61	48.46
11	56.32	57.91
12	52.17	49.15
13	66.73	66.29
14	66.18	68.44
15	62.65	62.25
Coefficiente de Correlación de Concordancia de Lin (R_C)		0.96

(*): Los porcentajes de pureza se calcularon en base a la lectura por triplicado de la muestra de cocaína.

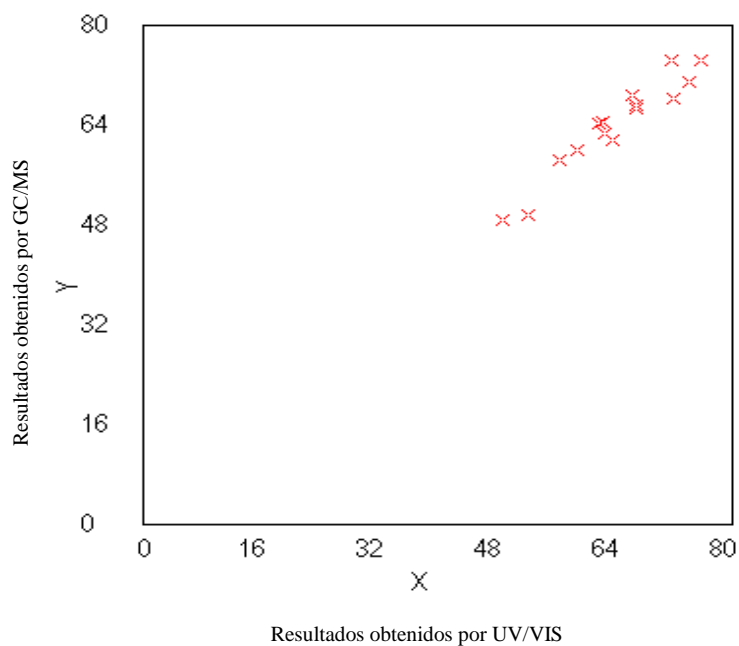
Cuadro 26.

Criterios evaluados para el análisis de reproducibilidad de la cuantificación de cocaína entre el método por GC/MS y UV/VIS

No.	Parámetro estadístico evaluado	Criterio de aceptación	Resultado	Cumple	
				SI	NO
1	Coefficiente de correlación de concordancia de Lin (R_c)	>0.75	0.96	x	
2	Valor p para la prueba t para media de dos muestras emparejadas ($\alpha=0.05$)	$> \alpha/2$	0.62	x	

Gráfico 3.

Análisis de concordancia entre el método por GC/MS y UV/VIS en la cuantificación de cocaína



Fuente: Datos experimentales, obtenidos mediante pruebas analíticas.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Evaluación del método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) para la cuantificación de cocaína

En el análisis de linealidad, los resultados obtenidos indican que el modelo ajustado fue capaz de explicar la respuesta (absorbancia) en función de la concentración. De manera que, en el intervalo de concentración comprendido entre 5 $\mu\text{g/mL}$ -30 $\mu\text{g/mL}$, se satisfacen los criterios de linealidad evaluados del método analítico. El coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación, con valores de 0.999 y 0.999 respectivamente, indican que la relación entre la respuesta analítica del método y la concentración se ajustan al modelo lineal. Así también, el análisis de varianza de la regresión lineal permitió determinar que el valor F calculado (16828.2) es mayor al F crítico (4.49), indicativo de que el modelo lineal se ajusta para la relación entre la absorbancia a partir de la concentración.

Por otra parte, los factores de respuesta fueron similares entre sí y cercanos al valor de la pendiente. En la prueba de linealidad aplicando el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV_f), se obtuvo un valor de 0.23% menor al 5.0% establecido como límite de linealidad, demostrando nuevamente la adecuada linealidad del método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) en el intervalo de concentración estudiado.

En la evaluación de exactitud, se obtuvo un promedio aritmético de los porcentajes de recuperación de 98.44%, valor que se encuentra comprendido dentro del rango de aceptación (95-105) % del recobro esperado. Así también, de acuerdo al intervalo de confianza construido a través de la distribución t de Student a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, dicho valor se encuentra comprendido dentro del intervalo y cumple con el criterio de aceptación. En la prueba de significación entre la recuperación media y el 100% de recuperación esperada, se obtuvo un valor t calculado (-1.9834) menor al

valor t tabulado (2.03) con un valor $p > 0.05$, por lo que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% de recuperación esperada. No se rechaza $H_0: \mu=100\%$ y se puede concluir que el método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) para la cuantificación de cocaína, es exacto.

La evaluación de precisión en términos de repetibilidad se llevó a cabo a través del análisis de 6 estándares de cocaína diferentes preparados al 100% de la concentración esperada. El coeficiente de variación para las réplicas de cada estándar fue menor de 2.0% y de igual forma, el coeficiente de variación global (1.43%) fue menor al 2.0%. Por lo que se comprueba que el método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) para la cuantificación de cocaína presenta repetibilidad, no habiendo diferencias significativas en condiciones homogéneas de trabajo.

B. Evaluación del método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) para la cuantificación de cocaína

En el análisis de linealidad, los resultados obtenidos indican que el modelo ajustado es capaz de explicar la respuesta (relación cocaína/estándar interno) en función de la concentración. De manera que, en el intervalo de concentración comprendido entre 5 $\mu\text{g/mL}$ -30 $\mu\text{g/mL}$, se satisfacen los criterios de linealidad evaluados del método analítico. El coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación, con valores de 0.999 y 0.998 respectivamente, indican que la relación entre la respuesta analítica del método y la concentración se ajustan al modelo lineal. Así también, el análisis de varianza de la regresión lineal permitió determinar que el valor F calculado (10575.93) es mayor al F crítico (4.49), indicativo de que el modelo lineal se ajusta para la relación entre la absorbancia a partir de la concentración.

Por otra parte, los factores de respuesta fueron similares entre sí y cercanos al valor de la pendiente. En la prueba de linealidad aplicando el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV_f), se obtuvo un valor de 3.09% menor al 5.0% establecido como límite de linealidad, demostrando nuevamente la adecuada linealidad del método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), en el intervalo de concentración estudiado.

En la evaluación de exactitud, se obtuvo un promedio aritmético de los porcentajes de recuperación de 100.7 %, valor que se encuentra comprendido dentro del rango de aceptación (95-105) % del recobro esperado. Así también, de acuerdo al intervalo de confianza construido a través de la distribución t de Student a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, dicho valor se encuentra comprendido dentro del intervalo y cumple con el criterio de aceptación. En la prueba de significación entre la recuperación media y el 100% de recuperación esperada, se obtuvo un valor t calculado (0.8739) menor al valor t tabulado (2.03) con un valor $p > 0.05$, por lo que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% de recuperación esperada. No se rechaza $H_0: \mu=100\%$ y se puede concluir que el método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) para la cuantificación de cocaína, es exacto.

La evaluación de precisión en términos de repetibilidad se llevó a cabo a través del análisis de 6 estándares de cocaína diferentes preparados al 100.0% de la concentración esperada. El coeficiente de variación para cada estándar fue menor de 2.0% y de igual forma, el coeficiente de variación global (1.30%) fue menor del 2.0%. Por lo que se comprueba que el método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) para la cuantificación de cocaína, presenta repetibilidad, no habiendo diferencias significativas en condiciones homogéneas de trabajo.

C. Determinación de reproducibilidad y concordancia para la cuantificación de cocaína entre el método por GC/MS y el método por UV/VIS

El coeficiente de correlación de concordancia de Lin, es un índice estadístico útil para evaluar el acuerdo entre dos métodos y la reproducibilidad en las mediciones realizadas (Nickerson, 1997, pp. 1503-1507). Lin (1989) ha demostrado que este método para evaluar estas características es superior a procedimientos usuales de comparación (coeficiente de correlación de Pearson, regresión, análisis de mínimos cuadrados, coeficientes de variación, coeficientes de correlación intraclase). Además mostró que la prueba es tan robusta, que puede determinarse con tan sólo 10 pares de datos (Mandeville, 2007, pp. 91-97).

El cuadro 25 muestra los resultados de cuantificación de quince muestras de cocaína de diferente pureza utilizando el método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y espectrofotometría ultravioleta/visible. A partir de estos resultados, se calculó el coeficiente de correlación de concordancia de Lin, siendo este de 0.96, lo cual se valora como concordancia sustancial entre ambos métodos. Los resultados obtenidos se graficaron, con el fin de observar si los puntos están sobre una línea a partir del origen y a 45° en un plano cartesiano, que corresponde a la línea en la que estarían los puntos si existiera perfecta concordancia. La gráfica 3 permite mostrar el análisis de concordancia de acuerdo con esta descripción realizada, pues los puntos derivados de los resultados de cuantificación se encuentran cercanos y persiguen el recorrido de la línea de concordancia.

Adicionalmente al análisis antes descrito, se llevó a cabo una prueba de t de Student para confirmar la equivalencia entre métodos. Se obtuvo un valor de t calculada (0.5040) menor que la t crítica (2.14) con un valor $p= 0.6221 (>\alpha/2)$. No se rechaza $H_0: M = 0$, por lo que puede concluirse que no hay diferencia significativa entre ambos métodos ($p>0.05$).

A través de estos resultados, puede concluirse que el método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) y el método por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS) son equivalentes para la cuantificación de cocaína sin adulterantes.

X. CONCLUSIONES

1. Se compararon los resultados de cuantificación de cocaína empleando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) y espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS).
2. El método por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) es lineal. Se demostró que la respuesta del método es proporcional a la concentración de cocaína en un rango de 5 µg/mL.
3. El método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) es lineal. Se demostró que la respuesta del método es proporcional a la concentración de cocaína en un rango de 5 µg/mL.
4. El método por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) es exacto. No existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% de recuperación esperado.
5. El método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) es exacto. No existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% de recuperación esperado.
6. El método por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) presenta repetibilidad, pues permite obtener resultados con una desviación estándar relativa menor a 2.0%.
7. El método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) presenta repetibilidad, pues permite obtener resultados con una desviación estándar relativa menor a 2.0%.

8. El método por espectrofotometría ultravioleta/visible es equivalente al método por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas, por lo que podría emplearse como método alternativo para la cuantificación de cocaína sin adulterantes.

XI. RECOMENDACIONES

1. Implementar y validar el método de cuantificación de cocaína sin adulterantes por espectrofotometría ultravioleta/visible en el Laboratorio de Sustancias Controladas del Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala -INACIF-, ya que proporciona resultados comparables con los obtenidos por medio del sistema de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
2. Continuar la investigación en la comparación de métodos analíticos para el análisis cuantitativo de otras sustancias controladas, ya que permite encontrar alternativas de análisis que proporcionan resultados igualmente confiables y equivalentes a las técnicas primarias de análisis.
3. Previo a utilizar la metodología propuesta en el presente estudio en diferente equipo instrumental al empleado, deben evaluarse nuevamente los parámetros de desempeño descritos.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonilla, D., Peñuela, L., Sierra, N., Díaz, J., y Rojas, J. (2008). Desarrollo y Validación de una Metodología Analítica por Espectrofotometría Ultravioleta para la Determinación de Cocaína en un Polímero Sintético. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 15(1),103-112.
- Block, J., & Beale, J. (1998). *Wilson & Gisvold's. Textbook of Organic Medical and Pharmaceutical Chemistry* (10th ed.). New York, United States of America: Lippincott-Raven Publishers.
- Bruneton. J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales* (2^a ed.) España: Acribia S.A.
- Carrillo, A. (1981). *Lecciones de Medicina Forense y Toxicología*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Calabuig, G. (1990). "Medicina Legal y Toxicología" (4^a ed.) España: Masson-Salvat Medicina.
- Chen, E. (1999). *Validación del Método de Cromatografía de Gases para Cuantificar la Pureza de Cocaína* (Tesis *ad gradum*). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Council of Europe (1980). *European Pharmacopoeia: Supplement 2001*. (3rd ed). (s.l): Author.
- Embajada de los Estados Unidos de América. Sección de Asuntos Narcóticos (NAS) (s.f.) Guatemala. Recuperado de: <http://www.nasgt.com.gt/incsrgtesp.htm>

- Gaínza, I. (2003). Intoxicación por Drogas. *ANALES Sis San Navarra*, 26(1),109-112.
- Guatemala. Congreso de la República de Guatemala. (1997). *Código de Salud: Decreto Número 90-97*. Guatemala: Autor.
- Guatemala. Congreso de la República de Guatemala. (1992). *Ley Contra la Narcoactividad: Decreto 48-92*. Guatemala: Autor.
- Guatemala. Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala. (s.f.) *Guía de Servicios Forenses*. Guatemala: Autor.
- Guatemala. Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala. (2008). *Análisis Cualitativo de Cocaína (PRO-DTC-LAB-009)*. Guatemala: Autor.
- Guatemala. Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala. (2009). *Memoria de Labores del Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala, Año 2009*. Guatemala: Autor.
- Guatemala. Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala. (2010) *Memoria de Labores del Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala, Año 2010*. Guatemala: Autor.
- Gutiérrez, M. (2002). *La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas: Identificación de Compuestos Causantes de Mal Olor*. Recuperado de:
<http://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/2733/1/5CROMGASES.pdf>
- Hardman, J., Limbird, L., y Gilman, A. (2001). *Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* (9ª ed). España: McGraw Hill.

- Katzung, B. (2007). *Farmacología Básica y Clínica* (10^a ed.). México: El Manual Moderno.
- Kaye, S. (1988). *Handbook of Emergency Toxicology. A guide for the identification, diagnosis, and treatment of poisoning* (5th ed.). United States: Charles C. Thomas Publisher.
- Kitson, F., Larsen, B., & McEwen, C. (1996). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry. A practical guide*. United States: Academic Press.
- Ladrón, J., y Moya, V. (1995). *Toxicología Médica: Clínica y Laboral* (4^a ed.). España: McGraw Hill.
- Mandeville, P. (2007, enero-marzo). El Coeficiente de Correlación de Concordancia de Lin. *Revista Científica: Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León*, 10(1), 91-97.
- Moffat, A., Osselton, M., & Widdop, B. (2004). (Vols. 1-2) *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: In pharmaceuticals, body fluid and post-mortem material* (3rd ed). London: The Pharmaceutical Press.
- Naciones Unidas. Oficina Contra la Droga y el Delito [UNODC] (2007). Informe Mundial Sobre las Drogas 2007. Recuperado de: <http://www.unodc.org/colombia/es/index.html>.
- National Institute of Water & Atmospheric Research [NIWA]. Taihoro Nukurangi (2009) Lin's Concordance. Recuperado de: <http://www.niwa.co.nz/our-services/online-services/statistical-calculators/lins-concordance>.
- Nickerson, C. (1997). A Note on: A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility. *Biometrics Journal*, 53(4),1503-1507.

Office on Drugs and Crime, United Nations (2003). *Terminology and Information on Drugs* (2^d ed). New York, United States of America: Autor.

Puerto Rico. Asamblea Legislativa de Puerto Rico. (s.f.). *Ley de Sustancias Controladas: Ley Núm. 4 de 23 de junio de 1971 (según enmendada hasta 1 de agosto de 2002)*. Puerto Rico: Autor.

Remington, A. (1987) (Vols. 1-2). *Farmacología* (19^a ed.). Argentina: Médica Panamericana S.A.

Skoog, D., Crouch, S., & Holler, J. (2001) *Principios de Análisis Instrumental* (5^a ed.). España: McGraw Hill.

The United States Pharmacopeia Convention. (2007) *The United States Pharmacopeia and the Nacional Formulary USP XXX/NF 25: The Official Compendia of Standards*. U.S.. United States: Author.

United Nations. Division of Narcotic Drugs. (1986). *Recommended Methods for Testing Cocaine: Manual for Use by National Narcotics Laboratories*. Viena, Austria: Autor.

XIII. ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS	Pág.
A. Anexo 1	
Evaluación de la metodología por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) para la cuantificación de cocaína	53
B. Anexo 2	
Evaluación de la metodología por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) para la cuantificación de cocaína	57
C. Anexo 3	
Comparación de los resultados de cuantificación de cocaína	61
D. Anexo 4	
Generalidades de la cocaína	63
E. Anexo 5	
Métodos para el análisis de cocaína	69
F. Anexo 6	
Espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS)	73
G. Anexo 7	
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GCMS)	75

A. Anexo 1. Evaluación del método por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS) para la cuantificación de cocaína

Cuadro 27. Resultados obtenidos en la evaluación de linealidad

Calibrador	Réplica	Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$) (x)	Absorbancia (nm) (y)	Factores de respuesta (y/x)
1	1	4.95	0.24086	0.048658586
	2	4.95	0.24063	0.048612121
	3	4.95	0.24089	0.048664646
2	1	9.90	0.48856	0.049349495
	2	9.90	0.48737	0.049229293
	3	9.90	0.48766	0.049258586
3	1	14.85	0.68088	0.045850505
	2	14.85	0.68059	0.045830976
	3	14.85	0.68056	0.045828956
4	1	19.80	0.88473	0.044683333
	2	19.80	0.88507	0.044700505
	3	19.80	0.88447	0.044670202
5	1	24.75	1.10810	0.044771717
	2	24.75	1.10800	0.044767677
	3	24.75	1.10770	0.044755556
6	1	29.70	1.33310	0.044885522
	2	29.70	1.33380	0.044909091
	3	29.70	1.33320	0.044888889
Promedio				0.83432
Desviación Estándar				0.00195
Coefficiente de variación (CV_f)				0.23357

Cuadro 28. Resultados obtenidos en el análisis estadístico de linealidad

ESTADÍSTICAS DE LA REGRESIÓN	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999524945
Coefficiente de determinación R ²	0.999050116
R ² ajustado	0.998990749
Error típico	0.012012244
Observaciones	18

Cuadro 29. Resultados obtenidos en el análisis estadístico de linealidad

ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F_{cal}	F_{crítica}	Valor p
Regresión	1	2.428203749	2.428203749	16828.17	4.49	1.3021E-25
Residuos	16	0.002308704	0.000144294			
Total	17	2.430512453				
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Valor p	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0.036516	0.006456387	5.655794643	3.58E-05	0.022829071	0.050202929
Pendiente	0.043446792	0.000334919	129.7234277	1.3E-25	0.042736796	0.044156787

Cuadro 30. Resultados obtenidos en la evaluación de exactitud

Patrón	Réplica	Concentración Nominal (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)	Porcentaje de recuperación (%)	Promedio aritmético, SD, CV(%)
1	1	4.95	4.84	97.6994	$\bar{x} = 97.78\%$ SD = 0.05641453 CV = 0.06
	2	4.95	4.84	97.7785	
	3	4.95	4.84	97.7413	
	4	4.95	4.84	97.8064	
	5	4.95	4.84	97.8157	
	6	4.95	4.84	97.8575	
2	1	4.95	4.40	88.9066	$\bar{x} = 88.65\%$ SD = 0.13265198 CV = 0.15
	2	4.95	4.39	88.6044	
	3	4.95	4.38	88.5579	
	4	4.95	4.38	88.5858	
	5	4.95	4.39	88.6741	
	1	4.95	4.38	88.5672	
3	2	14.85	14.93	100.5083	$\bar{x} = 100.56\%$ SD = 0.03512141 CV = 0.03
	3	14.85	14.93	100.5672	
	4	14.85	14.93	100.5284	
	5	14.85	14.93	100.5501	
	1	14.85	14.93	100.5687	
	2	14.85	14.94	100.6090	
4	3	14.85	15.31	103.0922	$\bar{x} = 103.12\%$ SD = 0.0382274 CV = 0.04
	4	14.85	15.31	103.1015	
	5	14.85	15.31	103.1278	
	1	14.85	15.32	103.1449	
	2	14.85	15.32	103.1681	
	3	14.85	15.30	103.0627	
5	4	29.70	29.73	100.0864	$\bar{x} = 100.19\%$ SD = 0.07034763 CV = 0.07
	5	29.70	29.75	100.1717	
	1	29.70	29.76	100.1872	
	2	29.70	29.79	100.3034	
	3	29.70	29.76	100.2027	
	4	29.70	29.76	100.2182	
6	5	29.70	29.78	100.2647	$\bar{x} = 100.36\%$ SD = 0.07975058 CV = 0.08
	1	29.70	29.79	100.2879	
	2	29.70	29.80	100.3267	
	3	29.70	29.82	100.3964	
	4	29.70	29.83	100.4507	
	5	29.70	29.83	100.4429	

Cuadro 31. Análisis estadístico para la evaluación de exactitud

Resultados		
Media	98.443	
Tamaño de la muestra	36	
Valor a contrastar	100.000	
Nivel de confianza	95.0%	
Media	IC (95.0%)	
98.443	96.849	100.037
Prueba t para una media		
Estadístico t	gl	Valor p
-1.9834	36	0.0552

Cuadro 32. Resultados obtenidos y análisis estadístico para la evaluación de precisión en términos de repetibilidad

Réplica	Número de estándar analizado					
	1	2	3	4	5	6
1	19.56	19.64	19.31	20.10	20.00	19.55
2	19.57	19.62	19.25	20.08	20.00	19.54
3	19.58	19.62	19.24	20.07	19.99	19.54
4	19.57	19.61	19.24	20.07	20.00	19.54
5	19.59	19.61	19.25	20.06	19.99	19.54
6	19.53	19.61	19.25	20.06	19.99	19.54
7	19.53	19.60	19.25	20.06	19.99	19.55
8	19.53	19.61	19.25	20.05	20.00	19.54
9	19.53	19.61	19.26	20.05	20.00	19.55
10	19.53	19.61	19.26	20.04	19.99	19.56
Promedio	19.55	19.61	19.26	20.06	20.00	19.54
SD	0.0234	0.0102	0.0210	0.0164	0.0055	0.0065
Coefficiente de variación	0.12%	0.05 %	0.11 %	0.08 %	0.03 %	0.03 %
Coefficiente de variación global	1.43%					

*SD = Desviación Estándar

B. Anexo 2. Evaluación del método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) para la cuantificación de cocaína

Cuadro 33. Resultados obtenidos en la evaluación de linealidad

Calibrador	Concentración nominal (µg/mL)	Relación Cocaína/Cocaína-D ₃		Factores de respuesta (y/x)
		Concentración (x)	Respuesta (y)	
1	4.95	0.25	0.227797955	0.911191819
	4.95	0.25	0.229636712	0.918546848
	4.95	0.25	0.227730953	0.910923813
2	9.90	0.50	0.495526743	0.991053487
	9.90	0.50	0.496124047	0.992248094
	9.90	0.50	0.496856088	0.993712177
3	14.85	0.75	0.717041023	0.956054697
	14.85	0.75	0.714213043	0.952284058
	14.85	0.75	0.716779349	0.955705798
4	19.80	1.00	0.963288022	0.963288022
	19.80	1.00	0.972177466	0.972177466
	19.80	1.00	0.967506425	0.967506425
5	24.75	1.25	1.222230278	0.977784222
	24.75	1.25	1.231880266	0.985504213
	24.75	1.25	1.221742182	0.977393746
6	29.70	1.50	1.455991598	0.970661065
	29.70	1.50	1.513044073	1.008696049
	29.70	1.50	1.516457223	1.010971482
Promedio				0.967539082
Desviación Estándar				0.029988326
Coefficiente de variación (CV_f)				3.099

Cuadro 34. Resultados obtenidos en el análisis estadístico de linealidad

ESTADÍSTICAS DE LA REGRESIÓN	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999524945
Coefficiente de determinación R ²	0.999050116
R ² ajustado	0.998990749
Error típico	0.012012244
Observaciones	18

Cuadro 35. Resultados obtenidos en el análisis estadístico de linealidad

ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F_{cal}	F_{crítica}	Valor p
Regresión	1	3.29842552	3.29842552	10575.933	4.49	5.3278E-24
Residuos	16	0.004990085	0.00031188			
Total	17	3.303415605				
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Valor p	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0.036516	0.006456387	5.655794643	3.58E-05	0.022829071	0.050202929
Pendiente	0.043446792	0.000334919	129.7234277	1.3E-25	0.042736796	0.044156787

Cuadro 36. Resultados obtenidos en la evaluación de exactitud

Patrón	Réplica	Concentración Nominal (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)	Porcentaje de recuperación (%)	Promedio aritmético, SD, CV(%)*
1	1	4.95	5.27	106.42	$\bar{x} = 106.93\%$ SD = 0.312191313 CV = 0.29
	2	4.95	5.30	107.03	
	3	4.95	5.30	107.02	
	4	4.95	5.30	107.06	
	5	4.95	5.28	106.71	
	6	4.95	5.31	107.31	
2	1	4.95	5.38	108.75	$\bar{x} = 109.07\%$ SD = 0.265116787 CV = 0.24
	2	4.95	5.39	108.84	
	3	4.95	5.39	108.95	
	4	4.95	5.41	109.36	
	5	4.95	5.40	109.15	
	1	4.95	5.41	109.37	
3	2	14.85	14.22	95.74	$\bar{x} = 95.888\%$ SD = 0.179274189 CV = 0.19
	3	14.85	14.22	95.77	
	4	14.85	14.22	95.73	
	5	14.85	14.25	95.95	
	1	14.85	14.25	95.94	
	2	14.85	14.29	96.20	
4	3	14.85	14.61	98.36	$\bar{x} = 98.72\%$ SD = 0.296440088 CV = 0.30
	4	14.85	14.69	98.90	
	5	14.85	14.62	98.43	
	1	14.85	14.66	98.69	
	2	14.85	14.72	99.14	
	3	14.85	14.68	98.83	
5	4	29.70	29.00	97.66	$\bar{x} = 97.55\%$ SD = 0.240012625 CV = 0.25
	5	29.70	28.97	97.53	
	1	29.70	29.06	97.85	
	2	29.70	29.01	97.67	
	3	29.70	28.86	97.16	
	4	29.70	28.93	97.42	
6	5	29.70	28.47	95.86	$\bar{x} = 96.48\%$ SD = 0.676010025 CV = 0.70
	1	29.70	28.56	96.16	
	2	29.70	28.43	95.72	
	3	29.70	28.70	96.64	
	4	29.70	28.88	97.22	
	5	29.70	28.89	97.28	

(*) SD = Desviación Estándar; CV = Coeficiente de variación.

Cuadro 37. Análisis estadístico para la evaluación de exactitud

Resultados		
Media	100.77	
Tamaño de la muestra	36	
Valor a contrastar	100.000	
Nivel de confianza	95.0%	
Media	IC (95.0%)	
100.77	98.	102.037
Prueba t para una media		
Estadístico t	gl	Valor p
0.8739	36	0.3881

Cuadro 38. Resultados obtenidos y análisis estadístico para la evaluación de precisión en términos de repetibilidad

Réplica	Número de estándar analizado					
	1	2	3	4	5	6
1	18.97	18.66	18.31	18.92	18.36	18.46
2	18.99	18.49	18.38	18.97	18.42	18.53
3	18.97	18.61	18.51	18.91	18.45	18.53
4	18.97	18.65	18.39	18.85	18.45	18.55
5	19.01	18.56	18.36	18.92	18.36	18.46
6	19.00	18.60	18.41	18.98	18.45	18.47
7	18.97	18.65	18.32	18.94	18.42	18.49
8	19.01	18.65	18.39	18.88	18.43	18.50
9	19.05	18.61	18.50	18.82	18.45	18.69
10	18.98	18.59	18.33	18.97	18.37	18.49
Promedio	18.9912	18.6079	18.3909	18.9173	18.4151	18.5169
SD	0.026	0.052	0.0687	0.055	0.0374	0.069
Coefficiente de variación	0.14	0.28	0.37	0.29	0.20	0.37
Coefficiente de variación global	1.30%					

*SD = Desviación Estándar

C. Anexo 3. Comparación de los resultados de cuantificación derivados del método por espectrofotometría ultravioleta/visible versus el método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

Cuadro 39. Resultados obtenidos en la determinación de pureza de quince (15) muestras de cocaína

No.	Resultados obtenidos de pureza (%)		Diferencia de mediciones	Promedio de mediciones
	GC/MS	UV/VIS		
1	75.52	73.88	1.64	74.7
2	71.52	74.07	-2.55	72.795
3	61.73	63.94	-2.21	62.835
4	66.70	66.70	0	66.7
5	73.90	70.55	3.35	72.225
6	62.38	64.11	-1.73	63.245
7	63.73	61.22	2.51	62.475
8	71.90	67.90	4	69.9
9	58.76	59.65	-0.89	59.205
10	48.61	48.46	0.15	48.535
11	56.32	57.91	-1.59	57.115
12	52.17	49.15	3.02	50.66
13	66.73	66.29	0.44	66.51
14	66.18	68.44	-2.26	67.31
15	62.65	62.25	0.4	62.45
Promedio	63.92	63.63	0.29	63.78
SD.	7.755154047	7.635484704	2.19243461	7.617075
Varianza	60.14	58.30	4.486	54.152

*SD: Desviación Estándar

Coefficiente de correlación de concordancia=

$$r_c = \frac{S_1^2 + S_2^2 - S_{(1-2)}^2}{S_1^2 + S_2^2 + (\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2)^2}$$

$$r_c = \frac{(60.14) + (58.30) - (4.486)}{(60.14) + (58.30) + (63.92 - 63.63)^2}$$

$$r_c = 0.96$$

Cuadro 40. Resultados obtenidos en la prueba t para medias de dos muestras emparejadas

Resultados	Variable 1	Variable 2
Media	63.92	63.63466667
Varianza	60.14241429	58.30062667
Observaciones	15	15
Coefficiente de correlación de Pearson	0.959533053	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	0.504047529	
P(T<=t) una cola	0.311033447	
Valor crítico de t (una cola)	1.761310115	
P(T<=t) dos colas	0.622066894	
Valor crítico de t (dos colas)	2.144786681	

D. Anexo 3. Generalidades de la cocaína

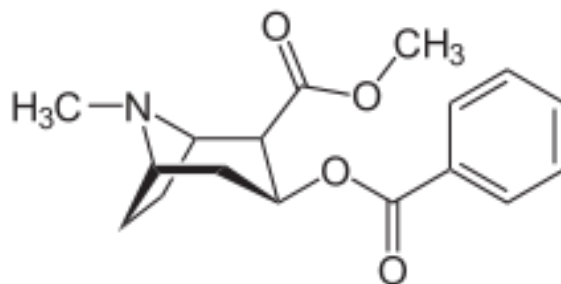
La cocaína es un alcaloide que se obtiene de las hojas de coca (*Erythroxylon coca* Lam). Este es un arbusto tropical que, aunque originario de Sudamérica, se ha adaptado a muy diversas zonas del globo, como el Norte de África, Sudeste Asiático, Taiwán, entre otros. Las hojas de la coca poseen aproximadamente 20 alcaloides, entre los que figuran además de la cocaína (principio psicoactivo), la benzoilecgonina, metilecgonina, ecgonina, cinamoilcocaína, que a su vez pueden convertirse en cocaína en un proceso de síntesis mediante múltiples reacciones estructurales. El contenido de alcaloides totales depende de la variedad y origen geográfico de la planta (Bruneton, 2001, pp. 818-820; Ladron, 1998, p. 605; Remington, 1987, p. 1745; United Nations, 2003, pp. 14-18).

La cocaína está presente en las hojas de la coca en concentraciones variables (0.5-2.5%). La manipulación que se hace para su consumo inicia con la recogida de las hojas y su secado posterior. En el proceso de obtención y producción ilícita del alcaloide, las hojas secas se trituran y maceran en agua acidulada con HCl. El macerado se filtra, alcaliniza y lava con keroseno o algún solvente equivalente. El extracto orgánico se separa y se deja secar, añadiéndose una pequeña cantidad de agua acidulada. El keroseno es removido y la solución se alcaliniza para que precipiten los alcaloides más básicos. El precipitado, que a menudo contiene una mezcla inorgánica de sales, así como también de cocaína cruda se separa y seca, dando como resultado la pasta de coca. Para producir clorhidrato de cocaína, la pasta de coca se disuelve en ácido sulfúrico diluido y se añade permanganato de potasio. La solución se filtra y el filtrado se alcaliniza, proceso que da lugar a la precipitación de cocaína base que posteriormente se lava con éter dietílico. Esta solución se filtra y se añade HCl y acetona para dar lugar a la precipitación del clorhidrato de cocaína, que luego se filtra y seca (Ladrón, 1995, p. 607; United Nations, 2003, pp. 14-18).

Es de esperarse que en la producción ilícita, existan algunas variaciones en la técnica y/o los reactivos utilizados para la extracción del alcaloide. Sin embargo, los detalles brindados anteriormente constituyen una aproximación al procedimiento general de obtención ilegal de la droga (United Nations, 1996).

La cocaína que se trafica internacionalmente tiene una pureza que oscila entre el 70 y 90%. Los contaminantes más comunes son anestésicos locales (lidocaína, procaína, benzocaína, etc.) o azúcares (manitol, lactosa, glucosa, etc.). La cafeína y la quinina al igual que otras sustancias de abuso tipo anfetamina, son también contaminantes relativamente comunes (United Nations, 1996).

1. Características físico-químicas



Fórmula molecular: $C_{17}H_{21}NO_4$

Peso molecular: 303.36 g/mol

La cocaína, es un sólido que se presenta en forma de cristales incoloros ó blancos ó polvo cristalino blanco ligeramente soluble en agua (~ 1 g en 600 cm^3 , pK_a 5.59 a 15°C); soluble en etanol (1 g en 7 cm^3 de cocaína base) y cloroformo, prácticamente insoluble en éter; funde a alrededor de 97° y su punto de ebullición es de alrededor $187\text{-}188^\circ\text{C}$. Desde el punto de vista químico es una 2-metil-3-bencilecgonina, que presenta un grupo amino-hidrofílico, conectado a un grupo intermediario a un residuo aromático lipofílico (Calabuig, 1990, pp. 672-673; Ladrón, 1995, p. 607; Remington, 1987, pp. 1745).

El clorhidrato de cocaína es un polvo blanco nívoo con sabor amargo, que característicamente embota la zona de la mucosa oral que se emplea para degustarla. Es soluble en agua, alcohol y cloroformo e insoluble en éter (Calabuig, 1990, p. 672). La cocaína es estable; una muestra conservada en un ambiente seco y en un contenedor bien cerrado, puede no mostrar descomposición después de 5 años. Las soluciones acuosas son estables en un pH inferior a 4, y se hidrolizan rápidamente en pH superior a 5.5 (Block y Beale, 1998, p. 649).

2. Toxicidad

a) Toxicocinética

Según su vía de entrada, la absorción es más o menos rápida (entre 30 segundos y 90 minutos) y su duración de acción oscila entre 20 y 180 minutos (Gaínza, 2003, p. 110).

Vía	Absorción máxima (minutos)	Duración de acción (horas)
Intravenosa	0.5-2.0	0.25-0.5
Intranasal	30	1-2
Gastrointestinal	60-90	>3
Pulmonar (fumada)	0.5-1.0	0.25-0.5

La vida media plasmática de la cocaína es de cerca de 50 minutos (0.8h \pm 2) y el volumen de distribución es de 2L/kg. La vía metabólica principal de la cocaína consiste en la hidrólisis de cada uno de sus dos grupos éster por esterasas hepáticas y plasmáticas. La benzoilecgonina, producida al perderse el grupo metilo, representa el principal metabolito urinario principal y se encuentra en la orina durante dos a cinco días después de su ingesta (Gaínza, 2003, p. 110; Hardman, Limbird, y Gilman, 2001, p. 609; Kaye, 1988).

b) Toxicodinamia

A nivel local la cocaína produce anestesia por bloqueo de los canales de sodio de las membranas axonales, y vasoconstricción por aumento de la producción de endotelina y disminución de la producción de óxido nítrico (Ladrón y Moya, 1995, p. 608).

En el sistema nervioso central, la cocaína impide la recaptación presináptica de dopamina, serotonina, norepinefrina y epinefrina, por lo que aumenta la concentración de estos neurotransmisores en los receptores postsinápticos. La expresión de este efecto farmacológico tiene expresión, fundamentalmente, a nivel del SNC y aparato cardiocirculatorio. El uso crónico provoca una depleción de neurotransmisores y una hipersensibilización de los receptores postsinápticos para los neurotransmisores (Calabuig, 1990, p. 672-673; Hardman, 2001, pp. 609-610; Ladrón, 1995, p. 608).

Las acciones de la droga se pueden resumir de la siguiente manera (Ladrón, 1995, p. 608):

- i. ***Sistema nervioso central.*** Excitación psíquica y motriz, disminución de la fatiga y sueño, euforia y disminución del umbral convulsivo. En dosis elevadas produce temblores y, más adelante, convulsiones tónico clónicas. La administración continuada en dosis altas genera reacciones psicóticas, con sensación de disforia, delirio de persecución, alucinaciones y conducta agresiva. Son frecuentes las pseudopercepciones alucinósicas, consistentes en pequeños insectos y parásitos que caminan por la piel, acompañadas de picor.
Si la concentración del tóxico es suficientemente alta, la depresión sigue a la estimulación, y tanto los centros vasomotores como los respiratorios se inhiben, pudiendo producir la muerte por parada cardiorespiratoria.
- ii. ***Aparato cardiovascular.*** Efecto vasoconstrictor energético, aumento de la frecuencia y gasto cardíaco y de la tensión arterial. En pacientes con cardiopatías previas puede desencadenarse insuficiencia cardíaca.
- iii. ***Otros.*** La cocaína es un potente pirógeno. Esta acción se produce tanto por su acción estimulante central, como por el aumento de la actividad muscular.

3. Tolerancia, dependencia y supresión

El uso continuado de la droga produce fenómenos de tolerancia. Esta, es muy poco acentuada sobre las acciones cardiovasculares, aunque si es intensa en la esfera psíquica. Por ello, el cocainómano requiere con el tiempo dosis más grandes de cocaína para lograr el estado de euforia (Hardman y otros, 2001, pp. 609-610).

Al cesar la administración de la droga tras períodos prolongados de uso, se produce un síndrome de abstinencia caracterizado por disforia, depresión, somnolencia, fatiga, deseo vehemente de la droga, alteraciones de la memoria y de la concentración, cuadros paranoides, letargia y aumento del apetito (Hardman y otros, 2001, pp. 609-610).

4. Dosis tóxica

Las dosis tóxicas mortales son muy variables y dependen de la vía de administración. En general, es difícil predecir qué exposición será tóxica debido a la variabilidad en el grado de pureza de la droga, la presencia de adulterantes y la diferente tolerancia individual de los consumidores. Los cocainómanos acostumbrados al consumo diario, pueden soportar dosis de 1 a 2 gramos sin gran sintomatología; sin embargo, estas personas pueden morir bruscamente después de una dosis masiva, a la cual ya estaban acostumbrados (Calabuig, 1990, pp. 672-673; Carrillo, 1981, p.315).

Los efectos tóxicos se empiezan a notar cuando la concentración en sangre es de 0.25-5.0 µg/ml y la muerte se alcanza cuando se alcanza una concentración de 1 µg/ml o más. La intoxicación presenta una clínica variable, puede evolucionar en tres fases (Calabuig, 1990, pp. 672-673):

- Primera fase: excitabilidad, inestabilidad emocional, ansiedad, cefaleas, náuseas, vómitos, midriasis, nistagmus vertical, bradicardia, hipertensión, taquipnea (aunque a veces se produce hipotensión y taquicardia), arritmias, vasoconstricción periférica, hipertermia, alucinaciones, alteraciones de las sensaciones táctiles: hormigueos, sensación de pequeñas arañas caminando bajo la piel o signo de Magnan, y fasciculaciones musculares.
- Segunda fase: convulsiones tónico clónicas parecidas al gran mal, aumento de la frecuencia, aumento de la frecuencia del pulso y de la presión arterial, cianosis, disnea con respiración irregular, acidosis láctica.
- Tercera fase: parálisis muscular, pérdida de reflejos, fallo respiratorio, cianosis, fracaso circulatorio, coma y muerte.

5. Usos terapéuticos

Las acciones clínicas deseables de la cocaína son el bloqueo de los impulsos nerviosos, a causa de sus propiedades anestésicas locales, y vasoconstricción local, secundaria a inhibición de la recaptación de noradrenalina. En la actualidad, tiene muy restringidas aplicaciones terapéuticas pues es una droga altamente adictiva. Sólo encuentra utilidad como anestésico de superficie sobre mucosas, en otorrinolaringología y odontología. Para ello, se utiliza en soluciones acuosas del clorhidrato, con una concentración del 1, 4 ó 10% para aplicación tópica. Algunas formulaciones especiales tienen mayores concentraciones.

Debe considerarse formalmente contraindicado el empleo de dosis totales de cocaína superiores a 200 mg en formulaciones que permitan su absorción mucosa o parenteral, rápida (Calabuig, 1990, pp. 672-673. ; Ladrón, 1995, p. 609; Remington, 1987, p.1746).

6. Empleo ilícito

En la actualidad, la cocaína se ha convertido en la sustancia de abuso de moda. Las formas principales de consumo son la absorción mucosa de la sal, comúnmente en forma de clorhidrato, la administración intravenosa de la sal, o la inhalación de la base libre (crack). La droga se denomina en argot con diversos nombres: coca, nieve, perico, dama blanca, bazuko, gran C, polvo de estrella, entre otros. (Calabuig, 1990, pp. 672-673.; Ladrón, 1995, p.610). La cocaína suele emplearse en combinación con otras sustancias. Las asociaciones más frecuentes son el alcohol y la heroína. La intoxicación etílica se potencia con la cocaína, generando un cuadro claramente placentero. La asociación con heroína, fumada, esnifada o por vía i.v., genera euforia intensa, especialmente cuando por esta última vía, y se describe como una sensación plana e intensamente satisfactoria por los sujetos adictos (Calabuig, 1990, p.673).

7. Legislación vigente

Guatemala es parte de la Convención Única de las Naciones Unidas de 1961 y su Protocolo de 1972, la Convención de las Naciones Unidas de 1971 sobre Substancias Psicotrópicas, la Convención de Drogas de las Naciones Unidas de 1988, la Convención Centroamericana para la Erradicación de la Producción, Tráfico, Consumo y Uso Ilícito de Drogas y Substancias Psicotrópicas y el Tratado Centroamericano sobre Ayuda Legal Conjunta para Asuntos Penales. Guatemala también ha firmado convenios antinarcóticos bilaterales, incluyendo intercambios de información, con México (1989), Venezuela (1991), Argentina (1991), Colombia (1992), Ecuador (1992), Perú (1994) y España (1999).

En cuanto a legislación interna, el Código de Salud en su Título II, Capítulo III, incluye en los artículos 178 al 181, las disposiciones relacionadas con el uso, consumo y vigilancia de los estupefacientes, psicotrópicos y sus precursores. Sin embargo, es la Ley Contra la Narcoactividad (Decreto Número 48-92), la que define y enfrenta de manera profunda la narcoactividad, y amplía los términos y conceptos que abarca el Código de Salud.

H. Anexo 4. Métodos para el análisis de cocaína

1. Análisis cualitativo

a) Pruebas de precipitación y color

Algunas pruebas para la identificación de cocaína se detallan a continuación. Un resultado positivo, es solamente un indicio presuntivo de la posible presencia de la sustancia.

- i. Prueba de Scott o Scott modificado: *Fase 1*: el material a ensayar se deposita en un tubo de ensayo y se agregan 5 gotas de reactivo de Scott y si el material contiene cocaína, inmediatamente adquirirá un color azulado. *Fase 2*: A esta solución se agrega 1 ó 2 gotas de HCl concentrado y se agita hasta que desaparezca el precipitado azul y la solución adquiera un color rosado. *Fase 3*: Por último, se añaden varias gotas de cloroformo hasta la formación de dos capas, una capa superior rosa y la capa inferior de cloroformo que adquirirá un color azul intenso si la muestra contiene cocaína (United Nations, 1986).
- ii. Reacción de Mayer (HgCl_2 , IK, H_2O): empleada para la caracterización no específica de alcaloides. La cocaína reacciona formando un precipitado blanco o amarillo claro (Kaye, 1988, p. 273).
- iii. Reacción de Dragendorff (solución saturada 10% de KI con BiI): empleada para la caracterización no específica de alcaloides. La cocaína reacciones formando un precipitado naranja-marrón (Kaye, 1988, p. 273).
- iv. Reacción con tiocianato de cobalto (2% en H_2O): la cocaína reacciona formando un precipitado azul, que no se disuelve tras la adición de 3 gotas de cloruro estañoso (Kaye, 1988, p. 274).

b) Observación microscópica de cristales

Se colocan 2 mg de la muestra en el portaobjetos de un microscopio y se añade una gota de HCl 0.1 N para disolver la muestra. Luego se añade 1 gota del reactivo PtCl_2 al 5% para después observar los cristales utilizando un aumento alrededor de 100 (United Nations, 1986).

c) Análisis instrumental

- i. Espectrofotometría ultravioleta/visible: se disuelve una porción de la muestra de cocaína en HCl diluido (1/20) a modo que se obtenga una solución 15µg/ml. De la misma manera, se debe preparar una solución con un estándar de referencia de cocaína. Se registran y comparan los espectros obtenidos para la solución estándar y para la solución de prueba de 200-360nm (INACIF, 2008; The United States Pharmacopeia Convention, 2007).

Los requerimientos se cumplen si el espectro de absorción UV de la muestra y el estándar exhiben la máxima y la mínima respuesta a la misma longitud de onda y si las absorbancias están entre los límites. Las bandas de absorción máxima a 233 nm y 275 nm son características de cocaína (INACIF, 2008; The United States Pharmacopeia Convention, 2007).

- ii. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Para la identificación de cocaína se compara el tiempo de retención y espectro de masas de la muestra de cocaína con el del estándar bajo condiciones idénticas. Los picos de las masas correspondientes de cocaína son el 82, 182, 83, 105, 303, 77, 94, 96. Se debe considerar un *Match Quality* mínimo de 90 como valor confiable para determinar la presencia de la droga (INACIF, 2008).

El resultado positivo para cocaína con la técnica de GC/MS sumado al resultado positivo de cualquier prueba instrumental o presuntiva, incluyendo las de colorimetría, es suficiente para detectar o identificar positivamente esta droga.

d) Otros:

- i. Espectroscopia infrarroja:

Se obtiene el espectrofotograma de Infrarrojo y se comparan los resultados obtenidos con los del estándar bajo condiciones instrumentales idénticas. Se certifica la presencia de cocaína si el espectrofotograma muestra los principales picos (método del disco de haluro) (United Nations, 1986).

ii. Cromatografía en capa fina convencional:

La cromatografía en capa fina es una técnica que se emplea para separar entre sí los componentes de una muestra. La separación se basa en que las sustancias se reparten de modo diferente según solubilidad en un solvente o fase móvil y adsorción a una placa o fase estacionaria. La técnica es utilizada rutinariamente para la detección de cocaína en diferentes matrices (United Nations, 1986).

Fase Estacionaria: Silica Gel 60 F₂₅₄ (10 x 10)

Fase Móvil: en la tabla se especifican tres sistemas de solventes, sus proporciones y los valores de Rf que caracterizan a la cocaína en dichas condiciones.

Fase móvil	CHCl ₃ :meOH (9:1)	meOH:NH ₄ OH (200:3)	Éter isopropílico:etanol (80:20)
Rf	95	73	71

Métodos para la visualización (United Nations, 1986):

- Luz Ultravioleta a 254nm.
- Reactivo de Iodoplatinato de potasio acidificado.
- Reactivo de Drangendorff.

2. Análisis cuantitativo

a) **Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

Para realizar el análisis cuantitativo de cocaína empleando esta técnica, se requiere la elaboración de una curva de calibración utilizando el método del estándar interno, sustancia que se añadirá a todas las muestras y estándares como referencia de las mediciones realizadas. Los calibradores se preparan empleando una serie de soluciones que contengan igual cantidad de estándar interno e incrementos en la cantidad de cocaína de pureza conocida. Al finalizar la lectura de las muestras, se obtiene una gráfica de la curva de calibración y se verifica que el coeficiente de correlación sea estadísticamente significativo (Gutiérrez, 2002; Kitson, 1996, p. 37).

Para cuantificar una muestra de cocaína, se determina inicialmente la abundancia de los iones cuantificadores, y su concentración se determina a partir de la curva de calibración.

b) Espectrofotometría ultravioleta/visible

Para la cuantificación de cocaína empleando esta técnica, es necesaria la construcción de una curva de calibración. Los calibradores se preparan empleando una serie de soluciones que contengan incrementos en la cantidad de cocaína de pureza conocida. Al finalizar la lectura de las muestras, se obtendrá una gráfica con absorbancias (en la ordenada) versus la concentración del analito (en la abscisa), y se verifica que el coeficiente de correlación sea estadísticamente significativo (Skoog, 2001, p. 369).

Para cuantificar una muestra de cocaína, se determina la absorbancia a una longitud de onda fija (máxima absorbancia) en el equipo, y su concentración se determina por medio de la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración.

c) Otros:

- i. Valoración: para la valoración de cocaína base, se disuelven cerca de 600 mg de cocaína en 50 mL de ácido acético glacial, se adiciona una gota de violeta cristal TS y luego se titula con 0.1N de ácido perclórico VS hasta un punto final verde. Por último se realiza una determinación del blanco y se hacen las correcciones necesarias. Cada mL de ácido perclórico 0.1N es equivalente a 30.34 de $C_{17}H_{21}NO_4$. La cocaína contiene no menos del 99% y no más del 101.0% de $C_{17}H_{21}NO_4$. (The United States Pharmacopeia Convention, 2007).
- ii. Cromatografía líquida de alta resolución: técnica utilizada para la determinación de cocaína en plasma y tejidos. Posee un límite de detección $<1\mu\text{g/mL}$ (Moffat y otros, 2004, p. 489).
- iii. Radioinmunoanálisis: técnica muy sensible para cuantificar metabolitos de cocaína en fluidos biológicos. En orina, posee una sensibilidad de 2 ng/ml para la determinación de benzoilecgonina (Moffat y otros, 2004, p. 489).

I. Anexo 5. Espectrofotometría ultravioleta/visible

La técnica espectrofotométrica ultravioleta-visible se basa en la capacidad que tienen las moléculas y los átomos de absorber radiaciones de 200-400nm y 400-800 nm, utilizando la energía de dichas radiaciones para producir cambios energéticos en su estructura. En los átomos estos cambios se refieren exclusivamente a transiciones electrónicas. En las moléculas los cambios energéticos son debidos a movimientos electrónicos, así como a movimientos de vibración y rotación (Calabuig, 1990, pp. 788-789).

Cuando la luz pasa a través de una solución que contiene una sustancia capaz de absorber, una parte de la luz es absorbida, otra parte es reflejada y el resto es transmitido. La cantidad de luz absorbida (absorbancia o densidad óptica de la solución) es proporcional a la concentración de la solución y a la longitud del camino recorrido a través de aquélla. Esta relación viene definida por la ley de Lambert-Beer, que en su expresión práctica se puede expresar como: $A = E \times c \times l$. Siendo c la concentración molar de la solución, l el camino recorrido por la luz y E el coeficiente molar (Skoog, 2001, p.364-366).

Las aplicaciones de este principio derivan del hecho que las transiciones electrónicas en una molécula dan origen a bandas de absorción específicas a determinadas longitudes de onda, que pueden ser usadas para la identificación de la molécula. Sin embargo, como las bandas de absorción ultravioleta son en general anchas, una misma señal puede ser manifestada por diferentes compuestos (Calabuig, 1990, pp. 788-789).

La intensidad de la absorción, es una medida de la concentración de la entidad absorbente presente en una muestra. Por esta razón, la construcción de curvas de calibración, usando patrones de concentración conocida, permite realizar una cuantificación precisa de los problemas (Calabuig, 1990, pp. 788-789).

1. Cuantificación de sustancias mediante medidas de absorción

La espectrofotometría UV/VIS es una herramienta utilizada en el análisis cuantitativo de sustancias. La técnica se caracteriza por: 1) gran aplicabilidad tanto para sistemas orgánicos como inorgánicos; 2) sensibilidad característica de 10^{-4} a 10^{-5} M; 3) selectividad de moderada a alta; 4) buena precisión y 5) adquisición de datos fácil y rápida (Skoog, 2001, p. 366).

J. Anexo 6. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Es la combinación sinérgica de dos poderosas técnicas analíticas. La cromatografía de gases separa los componentes de una mezcla, y la espectrometría de masas provee la información que se relaciona con la identificación estructural de cada componente (Kitson, 1996, p.3).

1. Cromatografía de Gases

Este instrumento provee un tiempo de retención para los componentes de una mezcla. El principio básico de operación de un cromatógrafo de gases implica la volatilización de la muestra en un inyector, separación de los componentes de la mezcla en la columna especialmente preparada y la detección de cada componente en un detector. Un aspecto importante del cromatógrafo de gases es el uso de un gas acarreador, como el hidrógeno o el helio, que transportan la muestra desde el inyector, a través de la columna, al detector. La columna contiene una cubierta de fase estacionaria. La separación de los componentes está determinada por la distribución de cada componente entre el gas acarreador (fase móvil) y la fase estacionaria. Un componente que permanezca por poco tiempo en la fase estacionaria eluirá rápidamente. Solamente aquellos materiales que pueden ser volatilizados sin descomponerse pueden ser sometidos a análisis por esta técnica (Gutiérrez, 2002; Kitson, 1996, p. 3).

2. Espectrometría de Masas

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas (Gutiérrez, 2002).

Además de moléculas ionizadas o iones moleculares (M^+) también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o

magnéticos. La velocidad alcanzada por cada ión será dependiente de su masa. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce el espectro de masas de la sustancia, que es diferente para cada compuesto químico y que constituye una identificación prácticamente inequívoca del compuesto analizado (Gutiérrez, 2002).

3. Cuantificación de sustancias

La cuantificación exacta en CG/MS requiere la adición de una cantidad conocida de un estándar interno en una alícuota exactamente pesada en la muestra analizada. El mejor estándar interno es aquel químicamente similar al analito de interés, pero que eluye en un espacio vacío en el cromatograma (Kitson, 1996, p.35).

Cantidades iguales y conocidas de estándar interno (W_{is}) es añadido a la solución de prueba y las soluciones de referencia. La concentración de la sustancia de prueba es determinada mediante la comparación de las áreas de picos o altura de picos de la sustancia a ser examinada y el estándar interno en la solución de prueba con las áreas de los picos o la altura de los picos de la sustancia a ser examinada y el estándar interno en la solución de referencia (Gutiérrez, 2002; Kitson, 1996, p. 37).