

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES QUE DESCARTEN LA PRESENCIA
DE COCAÍNA COMO DROGA DE ABUSO**

DIANA GAONA ACEVEDO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROYECTO DE GRADO II
SANTIAGO DE CALI**

2016

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES QUE DESCARTEN LA PRESENCIA
DE COCAÍNA COMO DROGA DE ABUSO**

DIANA GAONA ACEVEDO

Proyecto de grado

Tutor: Frankly Javier Urbano Ceron

Químico

Co-tutor: Guillermo Montoya

Químico Farmacéutico

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROYECTO DE GRADO II

SANTIAGO DE CALI

2016

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| AGRADECIMIENTOS | 5 |
| ABREVIATURAS | 6 |
| RESUMEN | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO | 11 |
| 2.1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 11 |
| 2.2 MARCO TEÓRICO | 13 |
| 2.2.1 ANTECEDENTES..... | 13 |
| 2.2.2 GÉNERO <i>Erythroxylum</i> | 13 |
| 2.2.3 COMPOSICIÓN DE LAS HOJAS DE <i>Erythroxylum coca</i> | 15 |
| 2.2.4 ALCALOIDES | 16 |
| 2.2.5 EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES..... | 20 |
| 2.2.6 FARMACOCINÉTICA DE LA COCAÍNA | 21 |
| 2.2.7 FARMACOCINÉTICA DE LOS METABOLITOS DE LA HOJA DE COCA | 22 |
| 2.2.8 DETECCIÓN DE BIOMARCADORES..... | 22 |
| 2.2.9 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS | 23 |
| 2.3 OBJETIVOS | 25 |
| 2.3.1 OBJETIVO GENERAL | 25 |
| 2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 25 |
| 2.4 VOLUNTARIOS | 25 |
| 2.4.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS..... | 25 |
| 2.4.2 CONVOCATORIA DE LOS VOLUNTARIOS..... | 27 |
| 2.4.3 SELECCIÓN DE LOS VOLUNTARIOS | 28 |
| 2.4.4 RETIRO DE LOS VOLUNTARIOS | 28 |
| 2.5 METODOLOGÍA UTILIZADA | 29 |
| 2.5.1 CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO | 31 |
| 2.5.1.1 TIPO DE DISEÑO | 31 |
| 2.5.1.2 UNIVERSO..... | 31 |
| 2.5.1.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA | 31 |
| 2.5.1.4 UNIDAD DE OBSERVACIÓN | 32 |
| 2.5.1.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN | 32 |
| 2.5.1.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN | 33 |
| 2.5.1.7 DEFINICIÓN Y MEDICIÓN DE VARIABLES INDEPENDIENTES..... | 33 |
| 2.5.1.8 DEFINICIÓN Y MEDICIÓN DE VARIABLES DEPENDIENTES | 33 |
| 2.5.1.9 PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS | 33 |
| 2.5.1.10 MÉTODOS O TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN..... | 33 |
| 2.5.1.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 34 |
| 2.5.1.12 SESGOS POTENCIALES | 34 |

| | | |
|-------------|-----------------------------------|-----------|
| 2.5.1.13 | POSIBLES EFECTOS ADVERSOS..... | 34 |
| 2.5.1.14 | CONDICIONES DE ENSAYO | 34 |
| 2.5.1.15 | REALIZACIÓN DEL ENSAYO | 35 |
| 2.5.1.16 | RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS | 35 |
| 2.5.1.17 | MATRIZ DE MARCO LÓGICO..... | 35 |
| 2.6 | RESULTADOS | 37 |
| 2.6.1 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 54 |
| 2.7 | DISCUSIÓN..... | 58 |
| 2.8 | CONCLUSIONES..... | 65 |
| 2.9 | RECOMENDACIONES | 66 |
| 2.10 | BIBLIOGRAFÍA..... | 67 |
| 2.11 | ANEXOS | 71 |

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradezco a Dios por iluminar siempre mi camino, por ayudarme a superar todos los obstáculos y cumplir con las metas que me he propuesto.

Mi más sincero agradecimiento a Frankly Urbano Cerón como tutor principal en la investigación, por su amabilidad, paciencia, colaboración y entrega en la realización del proyecto.

A mi Cotutor Guillermo León Montoya, por su apoyo y gestión.

A la Dra. Andrea Ramírez, por toda su colaboración, dedicación, apoyo y recomendaciones en la investigación.

Al Dr. Osmiro Coneo, por su apoyo y colaboración.

A la Organización Mente Sana y al Dr. Harold Colino por su cordialidad y apoyo incondicional en la recolección de muestras de cocainómanos.

A mi familia y amigos que estuvieron siempre atentos a mis requerimientos para sacar adelante el proyecto, por su apoyo y amor incondicional.

Por último, quiero agradecer a todos los voluntarios que colaboraron en el estudio, pues soy consciente que la recolección de muestras es un proceso incómodo para ellos y que a pesar de eso, accedieron a participar.

ABREVIATURAS

E. coca: *Erythroxylum coca*

EDME: Ecgonidina, metil éster

COC: Cocaina

EME: Ecgonina metil éster

B-HYDROXYTOL: hidroxitolueno butilado

BPP: 5H-benzo(b)piran-8-ol,2,3,5,5,8a-pentametil-6,7,8,8a-tetra

HEXADECANOICME: Ácido hexadecanoico, metil éster

BISNORABIETA: 10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno

PMM: Fenol,2,2-metilenobis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil-

AZEPINE: 1H-Azepina, hexahidro-1-(1-oxo-9-octadecenil)-

CINAMIC: Ácido p-Hidroxicinámico, etil éster

PPME: Ácido 2-propenoic, 3-fenil-, metil éster

BT: Benzeno, 1,2,4,5-tetrakis(1-metiletil)-

T-CYNNA: Trans-cinamilcocaína

CYNN: Cinamilcocaína

BHN: Benzamida,2-hidroxi-N-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil-)

OXI: Oxirano,2,2-[(1-metiletilideno)bis(4,1-fenileno oxi metil

AZABIC: 8-Azabicyclo[3.2.1]Oct-2-ene-2-ácido carboxílico, 8-metil-metil éster (1R,5S)

DI(T-BUTYL): 2,6-Di(T-butil)-4-hidroxi-4-metil-2,5-ciclohexadieno-1-uno

ALLEC: Allopseudometilecgonina

C-CYNNA: Cis-Cinamilcocaína

RESUMEN

La cocaína es un alcaloide que se extrae de las hojas del arbusto *Erythroxylum coca* que se encuentra en varios países, incluyendo el territorio Colombiano. La utilización del alcaloide ha tenido un gran impacto socioeconómico y ambiental, ya que su tráfico como droga alucinógena es considerado ilegal. Sin embargo, muchas personas consumen tradicionalmente las hojas de *Erythroxylum coca* debido a sus propiedades anestésicas, digestivas y para mejorar los síntomas del mal de altura, entre otras.

El propósito de este estudio consistió en identificar biomarcadores que permitan diferenciar entre el consumo de la cocaína procesada como droga de abuso y el consumo de hoja de *Erythroxylum coca*. El interés surgió con la finalidad de determinar si una persona involucrada en un proceso penal con cocaína en su organismo debe recibir un agravante punitivo si es consumidora de alucinógenos, en contraposición a quienes consumen la hoja de coca que no reciben ninguna sanción de acuerdo a la ley penal colombiana.

Para este fin, se realizó una caracterización previa de la hoja de coca que permitió, por medio de los espectros cromatográficos y de fragmentación de patrones de masas, determinar los diferentes compuestos químicos tanto de los extractos de la hoja de coca como del té de coca y estos, se compararon con las moléculas obtenidas en el análisis de muestras de orina humana. Estas muestras se clasificaron en tres grupos, de acuerdo al tipo de consumidor:

Grupo P; consumidores de té de coca, Grupo C; consumidores de cocaína y grupo N; no consumidores. A cada muestra se le realizó una extracción líquido-líquido con solventes orgánicos y sus extractos se analizaron por la técnica de cromatografía de gases con espectrometría de masas.

Se determinó que las moléculas 10,18-bisnorabieta-8,11,13-triene, ácido octadecanoico, ácido tetradecanoico y 1H-Azepina, hexahidro-1-(1-oxo-9-octadecenil)-), entre otras, se encontraban presentes en los consumidores de té de coca y ausentes en consumidores de cocaína. Por lo tanto, se puede afirmar que estos compuestos pueden ser marcadores diferenciales que permitan distinguir entre los dos tipos de consumo.

Palabras clave: Biomarcadores, *Erythroxylum coca*, cocaína, cromatografía de gases-espectrometría de masas, agravante punitivo.

ABSTRACT

Cocaine is an alkaloid extracted from the leaves of the shrub *Erythroxylum coca*, which is found in several countries, including the Colombian territory. The use of the alkaloid has had a great environmental and socioeconomic impact, as its traffic as hallucinogenic drug is considered illegal. However, many people traditionally consume *Erythroxylum coca* leaves due to its anesthetic, digestive properties and in order to improve the symptoms of altitude sickness, among other properties.

The purpose of this research consisted in identify biomarkers that can differentiate between the consumption of the pure cocaine as hallucinogenic drug and the consumption of the *Erythroxylum coca* leaf. The interest arose in order to determine whether a person involved in a criminal process with a cocaine in his body, should receive a punitive sanction if it is consumer of hallucinogens, as opposed who consumers the coca leaf that do not have any sanctions under Colombian criminal law.

For this intention, it is been realized a preliminary characterization of the coca leaf that allowed us through chromatographic spectra and fragmentation patterns of masses, determined the different chemical compounds both extracts of leaf of coca and the coca tea and these, were compared to the molecules obtained in the analysis of human urine samples. These samples were classified into three groups according to the type of consumer:

P group; consumers of coca tea, Group C; consumers of cocaine and group N; nonusers.

An extraction liquid-liquid was performed for each sample with organic solvents, and their extracts were analyzed by the technique of gas chromatography with mass spectrometry.

It was determined that the molecules bisnorabieta-10,18-bisnorabieta-8,11,13-triene, octadecanoic acid, 1H-Azepine, hexahydro-1-(1-oxo-9-octadecenyl)-, tetradecanoic acid, among others, were present at the consumers of coca tea and absent in cocaine users. Therefore, it can be stated that these compounds may be markers for differences in order to distinguish between the two types of consumption.

Keywords: biomarkers, *Erythroxylum coca*, cocaine, gas chromatography-mass spectrometry, punitive aggravating.

1. INTRODUCCIÓN

La utilización de la cocaína como droga de abuso ha tenido una rápida expansión ilícita en los últimos años debido al surgimiento de nuevas presentaciones y vías de administración para el consumo como: la “pasta base” y el “crack”. Colombia es uno de los países donde se cultiva el arbusto de *Erythroxylum coca* que contiene entre sus componentes el alcaloide de la cocaína. La utilización de esta droga ha generado grandes problemas legales, sociales y de salud pública en el país. Situación que afecta principalmente a la población indígena debido a que tradicionalmente esta comunidad utiliza la hoja de *Erythroxylum coca* para suprimir el hambre, la fatiga y para realizar sus respectivos rituales, en ocasiones con fines terapéuticos (Lipp, 2002). Las hojas se comercializan en diferentes presentaciones como las pomadas, infusiones de té, entre otros, que también son consumidos por muchas personas ajenas a la población nativa (Coca Nassa; Nasa Esh's, 2011).

Estas prácticas tradicionales no son consideradas como ilegales ni perjudiciales para la salud. Sin embargo, cuando se realiza un test o ensayo para detectar sustancias de estupefacientes tanto en consumidores de hoja de coca como en consumidores de cocaína, se tendrá un resultado positivo para cocaína. Por lo tanto, la diferenciación entre los tipos de consumo sería de gran importancia, no solo en el aspecto legal y forense, si no también, para evitar que la población indígena y las personas que ingieren normalmente la hoja de *Erythroxylum coca* sean juzgadas socialmente.

Es importante mencionar que las hojas de *Erythroxylum coca* no solamente contienen el alcaloide de la cocaína, también tienen otros componentes como flavonoides, vitaminas, alcaloides, taninos, entre otros (Jana Olivier, 2012). Algunos de estos, podrían actuar como biomarcadores para diferenciar entre el consumo de la hoja de coca y el consumo de cocaína procesada.

Debido a que en la extracción química de la cocaína hay una pérdida de los compuestos de la planta, estos biomarcadores solo se encontrarían presentes en muestras de orina de personas que consuman hoja de coca y se encontrarían ausentes en los cocainómanos.

Por esta razón, se analizaron muestras de orina de consumidores de cocaína procesada a manera de adicción, consumidores de *Erythroxylum coca* y muestras blanco, en donde se identificaron los compuestos químicos en cada muestra. Analizando los resultados, se determinó cuáles de estos compuestos podrían ser los posibles biomarcadores y además, se pretendía comprobar si higrina y cuscohigrina, alcaloides reportados en la literatura, pueden ser candidatos para la diferenciación entre los dos tipos consumo.

Cada muestra recolectada se congeló a -20°C hasta su uso, y se les realizó un pretratamiento de alcalinización para liberar los alcaloides. Posteriormente, se procedió a realizar una extracción líquido-líquido con solventes orgánicos no miscibles en agua. Finalmente, se analizaron los extractos obtenidos por medio de la técnica de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas.

El cromatógrafo de gases permite separar y detectar eficazmente compuestos volátiles que son visibles según los tiempos de retención. Además, este equipo cuenta con un detector de espectrometría de masas, en donde se obtienen los espectros de fragmentación y los patrones de masa de las moléculas analizadas.

Para realizar el procedimiento, en esta investigación se adoptó una metodología esencialmente para identificar los biomarcadores. Esta determinación, servirá para suministrar información a los organismos judiciales, quienes llegado el caso, podrán aplicar objetivamente justicia a una persona implicada en un proceso penal con cocaína en su organismo, ya que si se comprueba que la persona consumió hoja de coca no tendría por qué ser juzgada legalmente.

Según el código penal colombiano, cuando hay delitos contra la vida y la integridad personal, como un homicidio, y la persona culpable está bajo influencia de bebida embriagante, droga o sustancia que produzca dependencia física o mental, la pena se aumentará de la mitad al doble (Código penal Colombiano, 2000). De igual manera, esta situación ocurre con las lesiones personales, por ejemplo cuando existen lesiones que le impida a la víctima trabajar correctamente o cuando se genere una deformidad en cualquier parte del cuerpo. Además, se aplica cuando hay algún tipo de perturbación funcional o física transitoria, o pérdida anatómica y funcional de un miembro u órgano (Código penal Colombiano, 2000).

Cada una de estas situaciones tiene una pena de prisión diferente y en algunas ocasiones con multas en salarios mínimos legales mensuales vigentes para las personas juzgadas, dependiendo de la gravedad. En el caso de que se determine que la persona contiene cocaína en su organismo, estas penas se incrementarán significativamente.

Por lo tanto, la utilización de marcadores diferenciales entre el consumo de hoja de coca y de cocaína, facilitaría la toma de decisiones judiciales de una manera más objetiva.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Hasta el momento, en Colombia, no se ha implementado una manera de diferenciar entre un análisis de orina de una persona que consume cocaína como droga de abuso y una persona que consuma hoja de *Erythroxylum coca*. Como esta última práctica no genera adicción ni problemas sociales, se considera un asunto de baja prioridad. El uso de la cocaína ha tenido un gran impacto desde el punto de vista legal, forense, social, de salud y seguridad pública, debido a su alta farmacodependencia y lo que ésta genera. Se ha comprobado la existencia de cierta relación entre la cocaína y los actos delictivos, narcotráfico, hurtos, violencia, problemas sociales y familiares, que difieren totalmente del uso de la hoja de *Erythroxylum coca* como tradición y cultura.

Colombia tiene aproximadamente 48.000 hectáreas sembradas de *Erythroxylum coca* distribuida en 23 de los 32 departamentos del país. Más de la mitad de todos los cultivos se encuentran en tres departamentos: Nariño, Norte de Santander y Putumayo. Estos constituyen el 82% del cultivo de *Erythroxylum coca* junto con Choco, Antioquia, Bolívar y Cauca. (UNODC, Colombia, Monitoreo de cultivos de coca 2013, 2014)

Como consecuencia, Colombia ha sido catalogada internacionalmente como uno de los principales países productores de cocaína, debido a la exportación y producción del alcaloide que proviene de los cultivos. Esto ha generado grandes problemas internos, ya que esta droga ilícita presenta restricción legal y los grupos armados al margen de la ley la utilizan para su financiación.

Por estas razones, se ha expuesto una imagen negativa de la producción de la hoja de *Erythroxylum coca*, ignorando completamente que existen personas defendiendo tradiciones, culturas, fines terapéuticos, y por tanto, la representación de un legado de generaciones de poblaciones nativas de América del sur (Bruneton, 1993). Estas personas comercializan productos provenientes de la planta (infusiones, aceites, galletas, cremas, pomadas, harina, jabón, geles, caramelos, entre otros. (Coca Nassa; Nasa Esh's, 2011)), que constituyen un sustento para su economía.

Adicionalmente, el interés por destruir los cultivos ilícitos, generó un grave impacto ambiental negativo al utilizar herbicidas potentes como el glifosato, para la aspersión y erradicación de las plantas. Este mecanismo ha durado muchos años ocasionando grandes daños tanto en los cultivos de *Erythroxylum coca* como en cultivos ajenos, afectando el sostenimiento de las personas para vivir. A si mismo se ha detectado que el herbicida tiene efectos tóxicos en estas comunidades causando problemas de salud (Zapata, 2006). Estos aspectos, sin duda alguna,

han sido menos llamativos internacionalmente debido a que en muchos países se desconocen estas costumbres y los problemas internos que se desencadenan.

Por lo tanto, la identificación de biomarcadores que permitan diferenciar entre estas dos prácticas en las personas sería de vital importancia en el contexto legal y forense, ya que se podría excluir la determinación de cocaína como un aspecto ilegal, y por lo tanto, permitiría a las autoridades encargadas de administrar justicia tomar decisiones jurídicas más adecuadas.

La determinación de los biomarcadores y el uso de la técnica empleada pueden servir como base para el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan de manera rápida y efectiva diferenciar los usos de la planta de *Erythroxylum coca*. Además, se disminuiría significativamente el tiempo del análisis de las muestras, con lo que también se reducirían los costos del proceso, ya que actualmente se analizan manualmente los espectros y fragmentos de masa para identificar muchas de estas sustancias. De igual manera, es importante mencionar que los hallazgos también evitarían errores de detección y permitirían dar una aproximación para estandarizar las operaciones en el laboratorio.

Otro de los aportes de esta investigación es que ofrece información para que en estudios posteriores las moléculas candidatas se puedan comparar con estándares de referencia, lo cual facilitarían en gran medida la identificación de los marcadores diferenciales y permitirían mejorar la técnica analítica. Con este procedimiento, también se podrían realizar análisis cuantitativos que determinen la cantidad exacta de los componentes en las hojas, ya que actualmente no se encuentra disponible esta información. En este sentido, teniendo como base la información recolectada en el estudio, se adelantarían más investigaciones sobre las propiedades fisicoquímicas y características farmacológicas de las moléculas ya que como se ha mencionado, aquellas que se encuentran en las hojas contienen propiedades medicinales. Adicionalmente, sería de vital importancia indagar más sobre la farmacocinética de la infusión y el consumo de las hojas de coca, debido a que hasta el momento es poco conocida.

En este estudio, se analizaron algunos de los compuestos químicos que se encuentran en las hojas de coca de Colombia en donde se confirmó que la planta contiene varios alcaloides, antioxidantes, ácidos grasos, entre otros, que sirven para complementar la caracterización de las hojas de coca y permiten diferenciar el consumo de cocaína como droga de abuso. Por lo tanto, con estos hallazgos se protegerían las tradiciones y rituales sagrados de las poblaciones indígenas y se defendería el uso de las hojas de *Erythroxylum coca* como medicina alternativa.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 ANTECEDENTES

El arbusto de *Erythroxylum* se ha utilizado hace más de 5000 años por las poblaciones andinas para la producción de sus hojas (Novak, Salemink, & Khan, 1984). El imperio Inca utilizaba las hojas de *Erythroxylum coca* para mascarlas y emplearlas como medicamento, debido a sus capacidades de suprimir el hambre, la sed y el cansancio. Esta práctica se denomina “coqueo”, el cual también les permitía hacer sus rituales y ceremonias religiosas que eran sagradas. Sin embargo, se afirmaba que las personas pertenecientes a la población que abusaran de la utilidad de las hojas, con fines recreativos o lúdicos eran “estranguladas y despellejadas” (Córdoba, 2006). Por lo tanto, ellos defienden la práctica del coqueo como fin terapéutico, tradición y cultura, y manifiestan que consumir *Erythroxylum coca* a no es consumir cocaína.

La primera información detallada de los cultivos de *Erythroxylum coca* aparece en 1553 y en 1844 Gaed Kent aísla la cocaína de hojas de coca brasileñas. Pero su uso o aplicación fue a partir del año de 1859 cuando Albert Nieman empezó a emplear este alcaloide con fines terapéuticos aislando los cristales puros. Sigmund Freud y Carl Koller observaron propiedades anestésicas y estimulantes de la cocaína para el tratamiento de la morfinomanía y como anestésico en cirugías oftalmológicas. (Sneader, 2005). A finales del siglo XIX, en Estados Unidos se empieza a comercializar la coca en cigarrillos y soluciones y se inicia la industria comercial de la cocaína en Perú (1769) y en Colombia (1980). (Córdoba, 2006).

Habitualmente se consumía la sal de la cocaína, es decir, el clorhidrato de cocaína, ignorando el uso de la base. A partir de 1984, se inició en los países industrializados el consumo intensivo de cocaína base, lo cual apartó en gran medida el consumo de cocaína en forma de sal. (Córdoba, 2006).

2.2.2 GÉNERO *Erythroxylum*

Erythroxylum es un arbusto de plantas espermatofitas tropicales que se caracteriza por tener varias especies de hojas. Éstas, difieren de acuerdo a su aspecto físico y tamaño y la mayoría de las hojas tienen en su cara superior un color verde mas oscuro que la cara inferior (UNODC, 2012).

La clasificación científica del arbusto de *Erythroxylum* es la siguiente:

Tabla 1. Clasificación científica del arbusto *Erythroxylum* (Cedro, 2004).

| |
|----------------------------------------|
| Reino: <i>Plantae</i> |
| División: <i>Magnoliophyta</i> |
| Clase: <i>Magnoliopsida</i> |
| Orden: <i>Malpighiales</i> |
| Familia: <i>Erythroxylaceae</i> |
| Género: <i>Erythroxylum</i> |

De todas las plantas pertenecientes a esta clase, solo dos especies se utilizan para la producción de cocaína: *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron que se cultivan generalmente en América del sur (Evans, 2009). Para cultivar este tipo de especies, las condiciones ideales serían que crecieran en altitudes entre 600 y 2000 metros sobre el nivel del mar en ambientes calientes a temperaturas aproximadas de 20°C y con una humedad del 90%, en suelos arcillosos que contengan abundante nitrógeno (Cordero Vilca, 2002).

En Colombia se emplean ambos tipos de especies para la extracción del alcaloide. *Erythroxylum novogranatense* posee hojas de color verde-amarillento brillante, delgadas, con una lámina elíptica y alargada. La planta posee un olor característico, es frondosa, vigorosa, resistente y crece en presencia de calor y en épocas de sequía, pero también se cultiva en áreas húmedas. Inicialmente se cultivaba en la Costa Caribe y en la Sierra Nevada de Santa Marta. Sin embargo, en la actualidad se encuentra distribuida en muchos departamentos del país (Córdoba, 2006).

Esta especie consta de dos variedades taxonómicas: *E. novogranatense* var. *Novogranatense* y *E. novogranatense* var. *truxillense* (William, 2005).



Imagen 1. Hojas de especie *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron (William, 2005).

Erythroxylum coca es un arbusto de configuración piramidal que alcanza los cinco metros de altura, con flores de color blanco o amarillo y frutos rojos. Contiene hojas ovoides y se cultiva a temperaturas entre 15 a 20°C en ambientes húmedos (Córdoba, 2006). En esta especie existen dos variedades taxonómicas: *Erythroxylum coca* var. *Coca* y *Erythroxylum coca* Lam. var. *ipadu* Plowman (William, 2005).



Imagen 2. Hojas de especie *Erythroxylum coca* Lam (William, 2005).

Se afirma que generalmente el arbusto *E. novogranatense* tiene menor cantidad del alcaloide y que esto genera una mayor dificultad para su extracción. Sin embargo, actualmente se obtienen cruces genéticos con el fin de buscar más cantidad de cocaína y por lo tanto, se dificulta la clasificación botánica correcta de las hojas. (Córdoba, 2006).

2.2.3 COMPOSICIÓN DE LAS HOJAS DE *Erythroxylum coca*

Esta investigación se centro principalmente en el estudio de las hojas de *Erythroxylum coca* y por ello, se describirá la composición de este tipo de especies.

Las poblaciones indígenas afirman que las hojas de *Erythroxylum coca* tratan afecciones gastrointestinales, dolores musculares, y trastornos debido a la elevada altitud. Además suprimen la sed, el hambre y les permite trabajar mejor y eficazmente (Lipp, 2002).

Es importante mencionar que para la obtención de la cocaína se necesita aproximadamente entre 115 a 120 kg de hojas de *coca* para obtener 1 kg del alcaloide (Calabuig, 2004). Esto, refleja la gran diferencia entre el coqueo y el consumo de cocaína, ya que las hojas de coca no solo contienen esta molécula, sino que poseen otros compuestos y otras propiedades que no son perjudiciales para la salud. Entre ellos están otros alcaloides, flavonoides, taninos, vitaminas, minerales, entre otros (Jana Olivier, 2012).

Según la literatura, la hoja de *coca* puede contener los siguientes alcaloides: cinamilcocaína, metilecgonina, benzoilecgonina, higrina, cuscohigrina, tropacocaina, ecgonina metil éster, entre otros, que podrían ser biomarcadores

candidatos para la diferenciación entre un consumidor de hoja de coca y un cocainómano (UNODC, 2012).

2.2.4 ALCALOIDES

Los alcaloides son compuestos orgánicos de origen vegetal en su mayoría, que contiene en su estructura básica un sistema heterocíclico compuesto por un átomo de nitrógeno, que le confiere una cierta basicidad dependiendo de los sustituyentes. Se utilizan restringidamente a bajas concentraciones con fines terapéuticos debido a sus propiedades tan significativas. La solubilidad de estas moléculas depende en gran medida del pH, ya que se pueden encontrar en su estado de base o sal. Las bases son solubles en solventes orgánicos no polares, mientras que las sales son solubles en solventes más polares. Generalmente, estos alcaloides se encuentran en las hojas, tallos y raíces de las plantas (Bruneton, 1993).

Estudios anteriores han demostrado que los alcaloides encontrados en las hojas de coca pueden ser biomarcadores para diferenciar entre el consumidor de hoja de coca y el cocainómano. Por lo tanto, el estudio se centró principalmente en la extracción de estas moléculas.

A continuación se describen las principales características de los alcaloides de interés en la investigación.

Cocaína

La 2-metil-3-benzoilecgonina, conocida normalmente como Cocaína, es un alcaloide que se obtiene de la purificación de las hojas procedentes de las plantas de *Erythroxylum coca*. En la imagen 3 se encuentra la estructura química del alcaloide (Calabuig, 2004).

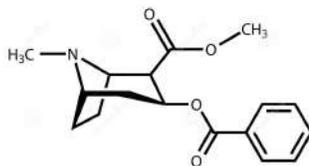


Imagen 3. Estructura química de la Cocaína

La cocaína (C₁₇H₂₁NO₄) tiene un peso molecular de 303,4 g/mol, con un punto de fusión de 98°C y de ebullición de 250°C. Es ligeramente soluble en agua (1 en 600 partes) y es soluble en etanol, éter etílico y cloroformo en su estado de base.

En estado de sal, clorhidrato de cocaína, su peso molecular es de 339,8 g/mol y tiene un punto de fusión de 195°C. El clorhidrato es soluble en agua, etanol y cloroformo y prácticamente insoluble en éter etílico (UNODC, 2012).

Conocer la solubilidad de la cocaína es clave para la extracción de los alcaloides de la hoja de coca, debido a que es la molécula que más se ha estudiado hasta el momento, en comparación con las demás. Además, esta investigación se centró en las propiedades de la cocaína base, ya que los metabolitos a estudiar presentan carácter básico.

Higrina

La higrina ($C_8H_{15}NO$) es uno de los alcaloides más volátiles que se extrae de las hojas de coca y contiene un núcleo de pirrolidina con propiedades básicas. Tanto la Higrina como la Cuscohigrina son productos secundarios de la biosíntesis de la cocaína, por la vía de la ornitina por medio del catión N-metil-delta1-pirrolinio (Bruneton, 1993).

Al parecer tiene una apariencia aceitosa, amarilla y su peso molecular es de 141.21 g/mol. Es soluble en solventes orgánicos como cloroformo, alcohol, éter etílico y es ligeramente soluble en agua (UNODC, 2012).

Hasta el momento no se ha encontrado alguna función en particular y se afirma que carece de acción anestésica y farmacológica (Novak, Salemink, & Khan, 1984).

La estructura química de la higrina es la siguiente:

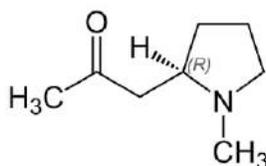


Imagen 4. Estructura química de la Higrina

Cuscohigrina

La Cuscohigrina ($C_{13}H_{24}N_2O$) es un alcaloide que también contiene anillos de pirrolidina. La diferencia entre este alcaloide y la higrina, es que la última contiene un anillo pirrolidínico, mientras que la Cuscohigrina contiene dos, como se puede observar en las imágenes 4 y 5 (Bruneton, 1993). Algunos estudios han demostrado que su concentración en las hojas de coca es alta, similar a la cocaína. Además, es posible detectar este alcaloide aun en bajas concentraciones en la orina, sangre, saliva, sudor y en el cabello (C. Rubio S. Strano-Rossi, 2012).

Posee un peso molecular de 224,3 g/mol y es soluble en cloroformo, etil acetato y metanol (UNODC, 2012).

Los estudios reportados afirman que estos alcaloides son buenos candidatos para diferenciar entre los cocainómanos y los consumidores de hoja de *coca*.

A continuación se encuentra su estructura química:

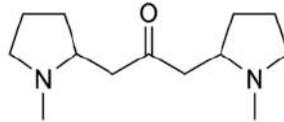


Imagen 5. Estructura química de Cuscohygrina

Cinamilcocaína

La Cinamilcocaína (C₁₉H₂₃NO₄) es uno de los alcaloides que se encuentra de manera abundante en las hojas de coca. Tiene un peso molecular de 329,4 g/mol y un punto de fusión de 121°C. La base es casi insoluble en agua, pero es soluble en etanol, éter etílico y cloroformo. La sal es soluble en todos estos solventes (UNODC, 2012).

Hasta el momento se desconoce la función exacta de este alcaloide y se han realizado estudios en animales donde se descartan propiedades midriáticas y anestésicas. De igual manera, no se ha encontrado que generen alguna acción farmacológica (Novak, Salemink, & Khan, 1984).

La estructura química de la cinamilcocaína es la siguiente:

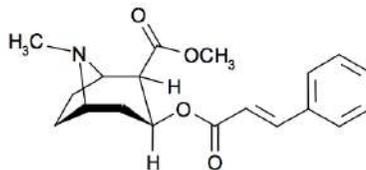


Imagen 6. Estructura química de la cinamilcocaína

Metilecgonina

La metilecgonina (C₁₀H₁₇NO₃) denominado también como ecgonina metil éster, es un alcaloide que tiene en su estructura un núcleo tropánico con un grupo metilo como se puede observar en la imagen 7.

Posee un peso molecular de 199,3 g/mol en su estado de base y en su estado de sal de 235,7 g/mol, con un punto de fusión de 215°C (UNODC, 2012).

Los estudios reflejan que tiene un efecto inhibitorio significativo sobre la captación de dopamina en la fracción sinaptosomal del cuerpo estriado de las ratas (Novak, Salemink, & Khan, 1984).

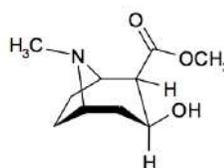


Imagen 7. Estructura química de la metilecgonina.

Benzoilecgonina

La benzoilecgonina (C₁₆H₁₉NO₄) es el principal metabolito de la cocaína y es detectado fácilmente después del consumo. Aún se desconocen aspectos de su farmacocinética en humanos, pero se ha demostrado que difiere en gran medida a la de la cocaína, debido a que puede permanecer mucho más tiempo en el organismo. Presenta una semivida plasmática de 6 a 8 horas y desaparece lentamente (Fernández, 2009). Este metabolito se forma por una hidrólisis de la cocaína que es catalizada por carboxilesterasas en el hígado y posteriormente, el alcaloide es excretado en la orina siendo detectado hasta la semana después de la absorción en el organismo (Drugbank, 2007).

Posee un peso molecular de 289,3 g/mol con un punto de fusión 195°C. Tanto la base como la sal son solubles en agua hirviendo y en etanol (UNODC, 2012).

De este alcaloide se han realizado estudios de farmacología en las ratas principalmente, en donde no hay acciones anestésicas considerables pero sí una afección en la captación de dopamina en la fracción sinaptosomal del cuerpo estriado de estos animales. A dosis más altas puede generar piloerección, respiración rápida e hiperactividad.

A pesar de la sintomatología que se presenta en los animales y de la permanencia en el organismo, se afirma que la benzoilecgonina es mucho menos tóxica que la cocaína (Novak, Salemink, & Khan, 1984).

A continuación se muestra la estructura química de la benzoilecgonina:

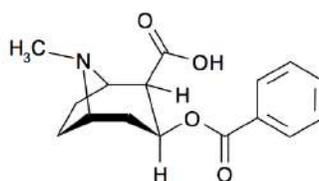


Imagen 8. Estructura química de la benzoilecgonina

Actualmente, se conoce poco sobre las propiedades farmacológicas de los metabolitos de la cocaína. Sin embargo, algunos de estos estudios manifiestan que tanto cuscohigrina, cinamilcocaina y benzoilecgonina a altas dosis suprimen

las células formadoras de anticuerpos en las respuestas de las células del bazo en ratas (Novak, Salemink, & Khan, 1984).

2.2.5 EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES

En el presente estudio se pretende identificar alcaloides que permitan diferenciar entre el consumo de cocaína como droga de abuso y el consumo de la hoja de *Erythroxylum coca*. Por esta razón, es de vital importancia emplear la extracción química de estos compuestos que servirán como posibles biomarcadores para tal diferenciación.

Normalmente los alcaloides se encuentran en forma libre y en sales en las hojas de coca, junto con los demás componentes. Las hojas de coca deben ser sometidas a un tratamiento alcalino para separar los alcaloides de las sales (Bello, 2000). Por ejemplo, para la extracción de cocaína en laboratorios clandestinos, las hojas se pisan y se tratan con hidróxido de calcio y agua. Luego, se extraen los alcaloides con un solvente no miscible con el agua, en este caso, la gasolina o keroseno. Posteriormente, se realiza una extracción con ácido sulfúrico y agua, el cual fija los alcaloides en la fase acuosa en forma de sales (Bruneton, 1993). A esta mezcla, se adiciona un componente alcalino como hidróxido de amonio, junto con permanganato de potasio. En este proceso se genera la “cocaína base”, o lo que en Colombia se denomina “bazuco”. Este, es un producto intermedio de la refinación de las sales de la cocaína y contiene un alto contenido de impurezas como metanol, éter, acetato, ácido benzoico, entre otros, que pueden generar mayor riesgo en la salud física y mental (Córdoba, 2006).

Para obtener la base libre se separan los alcaloides con solventes orgánicos como diclorometano, cloroformo, éter etílico y se extrae la fase orgánica, que posteriormente se evapora al vacío (Bello, 2000).

La cocaína free base o “crack”, es cocaína base que se obtiene devolviendo la cocaína sal de alta pureza a cocaína base, donde se utilizan sustancias químicas como amoniaco y bicarbonato. El crack es un producto de alto riesgo, su absorción es muy rápida en los pulmones y alcanza el cerebro en muy poco tiempo, ocasionando euforia más rápida y fuerte (Sifre, 2004). Los riesgos pueden aumentar cuando también se ingiere simultáneamente alcohol, con el propósito de generar una estimulación por parte de la cocaína y un efecto depresor por medio del alcohol para retardar los efectos que se producen. Esto es peligroso, ya que se pueden generar graves intoxicaciones agudas ya sea por alcohol o por cocaína. Particularmente, al realizar esta práctica se genera un compuesto llamado “cocaetileno” (Córdoba, 2006), que es una molécula que se identifica frecuentemente en los cocainómanos y en las comunidades indígenas, ya que en muchas ocasiones ellos realizan sus rituales con hoja de coca y alcohol.

Actualmente, todas estas formas de consumo son las más comunes. Sin embargo, la elección de la forma de presentación, depende de la vía de administración que se vaya a emplear. Por ejemplo, el clorhidrato de cocaína al ser soluble en agua y termolábil, no se fuma y se utiliza principalmente por inhalación o por vía intravenosa. Mientras que la base, es más termo-resistente y no es hidrosoluble, por lo tanto, si se puede fumar al igual que la pasta y el crack (Córdoba, 2006).

2.2.6 FARMACOCINÉTICA DE LA COCAÍNA

Todas las maneras de consumo anteriormente mencionadas pueden provocar los efectos característicos de la cocaína, es decir, la inhibición de la receptación pre-sináptica de monoaminas; dopamina, noradrenalina y serotonina, los cuales generan un aumento de estos neurotransmisores en la sinapsis (Ripoll, 2011). Por lo tanto, estos mecanismos producen fenómenos de euforia y un gran gasto energético, generando en muchas ocasiones alta dependencia. En algunos países, se aprueba su uso únicamente como anestésico local y vasoconstrictor, generando un efecto tópico sobre las membranas de las mucosas específicamente en la cavidad oral, laringe y cavidades nasales. (Brunton, Lazo, & Parker, 2006). En el caso de la hoja de *Erythroxylum coca*, el contenido de cocaína se encuentra entre 0,5 y 2,5% (Córdoba, 2006). De acuerdo a la cantidad de cocaína que se encuentra en las bolsas de té de coca, se han encontrado varias teorías con diversas concentraciones. Por lo tanto, se estima que la cantidad aproximada del alcaloide en una bolsa de té varía entre 20 a 30mg (Suzan Mazor, 2006)

La cocaína se absorbe muy bien, entre el 60 y 80% en las membranas de las mucosas, y en todas las vías de administración. La distribución es poco conocida, pero se afirma que cruza rápidamente la barrera hematoencefálica y la placenta (ANMAT, 2012).

En cuanto al metabolismo según la administración vía tópica, la cocaína se metaboliza por esterasas plasmáticas principalmente, y en el hígado se degrada a benzoilecgonina y ecgonina metil éster por medio del CYP450. Posteriormente, se excreta especialmente por la orina con menos del 10% sin cambios y con una vida media de 0,7 a 1,5 horas. Además, este alcaloide también se puede excretar por la leche materna en el caso de que la mujer se encuentre en estado de lactancia (Epocrates, 2015) (ANMAT, 2012).

La cocaína puede ser detectada en muestras de sangre hasta las 12 horas y en orina hasta aproximadamente una semana. También, se puede detectar el alcaloide en saliva, sudor y en el cabello hasta las 24 horas, 2-3 días y hasta 1 año respectivamente (Barrera & Duque, 2011). Es importante mencionar que la detección de la cocaína dependen de varios factores como la cantidad de cocaína

ingerida, del metabolismo de cada persona y de la eliminación e ingesta de los líquidos (Franklin Alcaraz del Castillo, 2005).

En cuanto a las dosis tóxicas del alcaloide, según la literatura, la máxima cantidad de cocaína tolerada en el organismo varía entre 0,3 g por vía parenteral y 2,5 g por vía oral. La dosis mortal por vía endovenosa para el adulto es mayor de 1 gramo por toxicidad directa sobre el músculo del corazón y la dosis promedio de abuso por vía inhalatoria o por vía oral se encuentra entre 8,7 y 14 mg (Córdoba, 2006).

Estos datos de concentración y la farmacocinética del alcaloide son importantes y se deben tener en cuenta al momento de realizar ensayos clínicos en seres humanos, ya que estos datos podrían ser una aproximación de la cantidad adecuada que se debe utilizar de las hojas de *Erythroxylum coca*. Además, esta información se tuvo en cuenta al momento de recoger las muestras de los cocainómanos. Por lo tanto, estas se recolectaron durante los 4 días (como máximo) después del último consumo.

2.2.7 FARMACOCINÉTICA DE LOS METABOLITOS DE LA HOJA DE COCA

Actualmente poco se conoce de la farmacocinética de los demás componentes de la hoja de coca. Sin embargo, estudios han demostrado que a partir de las 2 horas del último consumo de la hoja, en este caso del té, empiezan a aparecer en las muestras de orina moléculas como benzoilecgonina, que es el principal metabolito de la cocaína, superando el umbral de registro positivo que es de 300 ng/ml. Además, también se ha encontrado que en las primeras horas de la ingestión los metabolitos aparecen a concentraciones mayores que en los días posteriores (Suzan Mazor, 2006).

Según los estudios, los metabolitos del té de coca permanecen hasta una semana en la orina como se había mencionado anteriormente, por lo tanto, se deben recoger las muestras durante este intervalo de tiempo. Además, se debe tener en cuenta que la determinación de los metabolitos, depende de la cantidad de consumo, el metabolismo del individuo y la cantidad de líquidos que ingiera/elimine la persona, de manera similar a la detección de cocaína (Franklin Alcaraz del Castillo, 2005).

2.2.8 DETECCIÓN DE BIOMARCADORES

Como se había dicho anteriormente, aislar la cocaína de la hoja de *Erythroxylum* requiere determinados procesos de extracción para obtener el alcaloide puro. Mediante el procedimiento de purificación, se pierden ciertos alcaloides y otras

moléculas de la hoja que no representan importancia comercial (C. Rubio S. Strano-Rossi, 2012). Pero, cuando la hoja de *Erythroxylum coca* es usada con fines tradicionales, todos los metabolitos vegetales de la planta incluyendo los alcaloides, ingresan al organismo siendo posible detectarlos sin metabolizar o metabolizados en los fluidos corporales. Muchas personas y específicamente la población Andina utilizan la masticación o infusión de *Erythroxylum coca* de manera tradicional.

Hasta el momento, se han realizado estudios sobre los efectos de la cocaína y la hoja *Erythroxylum coca* en el organismo y se han desarrollado ensayos de estupefacientes. Sin embargo, ha sido de poco interés la diferenciación de estas dos prácticas en Colombia.

En la literatura se ha mencionado que existe dos alcaloides principales: higrina y cuscohigrina, que pueden actuar como biomarcadores en la hoja de *Erythroxylum coca*, debido a que se encuentran ausentes cuando se realiza la purificación de la cocaína (C. Rubio S. Strano-Rossi, 2012). En otro estudio, mediante el análisis de cabello de voluntarios que mascaron *Erythroxylum coca* y de cocainómanos, se muestra la discriminación de consumidores de coca y consumidores de cocaína procesada. Como resultado, se obtuvieron datos cualitativos de higrina y se detectaron dos metabolitos de cuscohigrina que no se encontraron en el cabello de los cocainómanos (Rubio, Hastedt, Gonzalez, & Pragst, 2014).

Es necesario tener presente, que los estudios que se han realizado se centran en los estudios y en las hojas de *Erythroxylum coca* provenientes de cultivos en Argentina, Bolivia y Perú. Por lo tanto, este proyecto evaluó las hojas de *Erythroxylum coca* que son utilizadas en Colombia, para comprobar si estos compuestos mencionados anteriormente sirven como biomarcadores. Adicionalmente, se investigó que otros posibles componentes de estas hojas permiten la diferenciación de interés en el estudio. Para esto, se empleó la técnica de cromatografía de gases y espectrometría de masas para la identificación de los compuestos.

2.2.9 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La cromatografía de gases (CG) es la técnica más ampliamente utilizada para la separación y detección de compuestos volátiles en mezclas complejas. Tiene alta sensibilidad, resolución y permite determinar separaciones más rápidas en comparación con otras técnicas analíticas. Además, tiene la capacidad de realizar separaciones de sustancias muy semejantes y requiere poca cantidad de muestra. (Douglas A. SKOOG, 1997) (Harris, 2006).

En cuanto a la espectrometría de masas es una técnica analítica que permite identificar y cuantificar compuestos dilucidando su estructura y propiedades químicas por medio de la ionización de la muestra. Gracias a esto, se puede estudiar las masas de los átomos y la fragmentación de moléculas de una manera determinada (Harris, 2006).

Esta técnica complementa la separación por cromatografía de gases, convirtiéndose en un sistema eficaz para la determinación de los compuestos que se encuentran en las hojas de *Erythroxylum coca*.

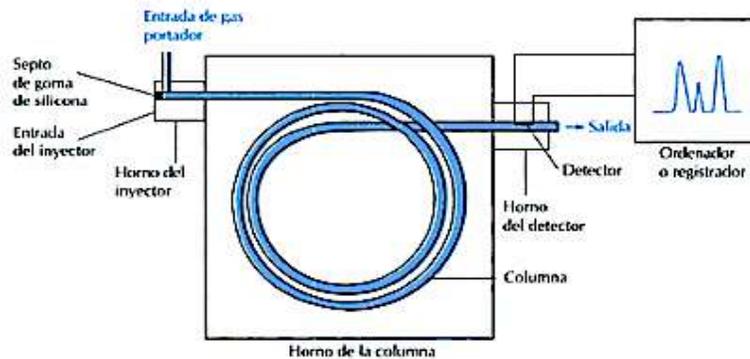


Imagen 9. Diagrama de un cromatógrafo de gases (Harris, 2006).

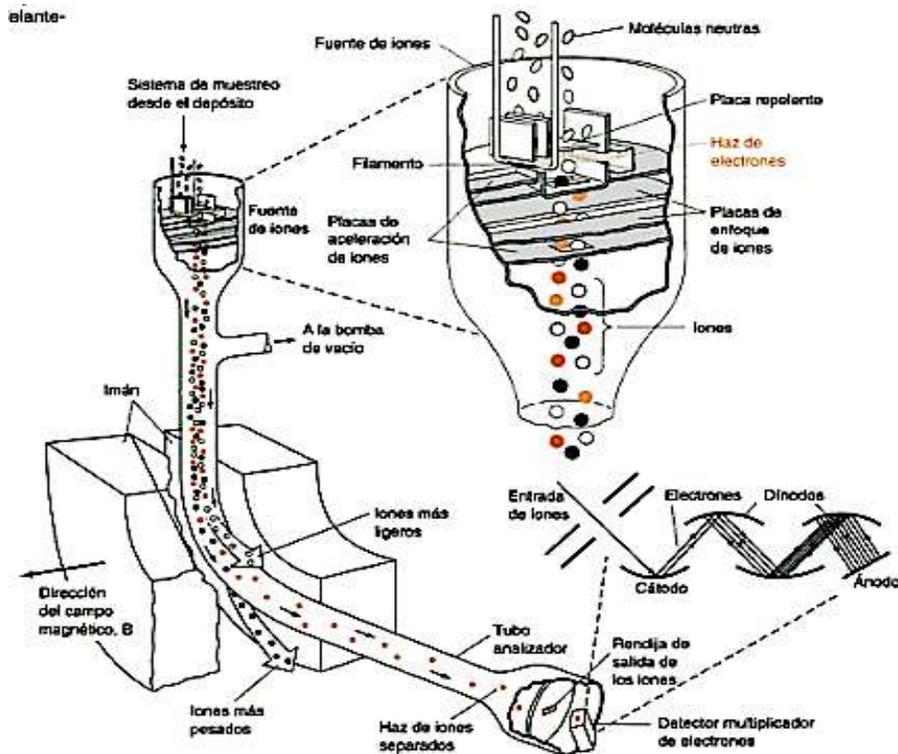


Imagen 10. Diagrama de un espectrómetro de masas (Harris, 2006).

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar al menos dos biomarcadores de tipo alcaloidal, que permitan diferenciar entre el consumo de cocaína como droga de abuso y el consumo de hoja de *Erythroxylum coca*.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar en muestras de orina los posibles compuestos químicos de tipo alcaloidal de *Erythroxylum coca* que se encuentren en los consumidores de hojas o té de *coca* y en cocainómanos.
- Identificar posibles biomarcadores en los compuestos extraídos.
- Comprobar si los alcaloides Higrina y Cuscohigrina reportados en la literatura, están presentes en las muestras y confirman que pueden ser biomarcadores para la diferenciación de un consumidor de hoja de *Erythroxylum coca* y un cocainómano.

2.4 VOLUNTARIOS

2.4.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Antes de empezar con la investigación se le brindó la información pertinente a las personas interesadas en participar sobre la justificación, objetivos y metodologías del estudio. Además, se les explicó adecuadamente los procedimientos y el propósito de la investigación, en donde los voluntarios involucrados tenían la autonomía y libertad de aceptar o rechazar su participación.

Se realizó un consentimiento informado mediante el cual se garantizaba que el sujeto había expresado voluntariamente su intención de cooperar en el estudio, después de haber comprendido completamente la información que se le había suministrado acerca de los beneficios, molestias, derechos, posibles riesgos y sus respectivas alternativas.

Además, en el documento también se hizo una explicación concisa del proceso a realizar a los voluntarios interesados en consumir las hojas de coca, con el fin de evidenciar el interés del voluntario a la exposición del material en estudio.

Se consiguieron muestras de orina espontánea de tres grupos de personas de la siguiente manera:

- Personas consumidoras de cocaína, con último consumo no mayor de cuatro días.
- Personas consumidoras de hoja de coca, que aceptaron voluntariamente tomar infusión de té suministrado por el equipo de investigación y con un último consumo no mayor a 24 horas.
- Personas no consumidoras, ni de cocaína procesada, ni té de coca. Este grupo pertenece a las muestras blanco.

Al aceptar la participación los voluntarios firmaron el consentimiento informado y posteriormente, se les realizó una valoración médica e historia clínica completa por parte del médico asesor del proyecto. Se evaluó el estado de salud actual del paciente, las manifestaciones clínicas por el consumo de la sustancia en estudio, sus antecedentes médicos, farmacológicos, quirúrgicos-alérgicos, entre otros. Con esta información, se determinó las personas candidatas de acuerdo a los criterios de inclusión.

En este estudio, también se tuvo en cuenta la *Resolución No 008430 de 1993 del Ministerio de Salud* y se siguieron los principios básicos de Helsinki, en donde se respeta al individuo en su totalidad y se vela ante todo por su salud, vida, integridad y dignidad. Además como se mencionó anteriormente, los voluntarios tuvieron la autonomía y libertad de aceptar o rechazar su participación.

Durante la elección de estos voluntarios, las personas tuvieron la garantía de una respuesta clara y oportuna a cualquier pregunta del procedimiento y los aspectos relacionados con la investigación. A las personas que accedieron a participar, se les realizó un proceso de selección de acuerdo a los criterios de inclusión planteados por el grupo investigador, teniendo en cuenta que estas personas debían ser ajenas a los cursos dictados por los profesores involucrados en el estudio o que estuvieran bajo órdenes de los profesionales que participan en la investigación.

Es importante aclarar que no se presentó ningún beneficio directo para las personas involucradas. El beneficio estaba encaminado a la participación en el procedimiento para demostrar que el consumo tradicional de *Erythroxylum coca* difiere en gran medida al consumo de cocaína.

Con respecto a los cocainómanos, también se les pidió firmar el consentimiento informado cuando se encontraran en un buen estado de conciencia y se les explicó de igual manera, el propósito y el proceso del estudio teniendo en cuenta todos los aspectos éticos. Sin embargo, algunos de estos voluntarios dieron su muestra sin aportar datos personales en el consentimiento, debido al temor de ser

juzgados, por incomodidad o por otras razones que son totalmente respetables. Además, en ningún momento las personas fueron subordinadas u obligadas por disminución de su capacidad cognitiva para que participaran.

Todas éstas y demás situaciones que se presentaron, se anotaron respectivamente en la historia clínica y en el consentimiento informado de cada persona.

En cuanto a la información obtenida durante el proceso, se tuvo la total confidencialidad de la información privada y la identificación de las personas. Además, la información se guardó en medios electrónicos con contraseñas y en lugares que pertenecen únicamente a los investigadores principales. El consentimiento informado en físico firmado por los participantes, se guardó en una carpeta perteneciente a un miembro del grupo investigador y se mantuvo en un archivador con llave. Por lo tanto, es el único lugar donde se tiene acceso al nombre del participante. Por esta razón, cada voluntario se identificó con un código que fue empleado en los demás documentos, en los recipientes donde se recolectaban las muestras y en los resultados. Adicionalmente, todos los archivos utilizados y guardados en medios electrónicos se encuentran en un pdf encriptado.

También, se tuvo en cuenta los siguientes aspectos éticos:

- “Todo ser humano es autónomo e inviolable”
- “Todo ser humano tiene iguales derechos”
- “Ningún ser humano tiene derecho a hacer daño sin necesidad”
- Se le respetará al participante sus derechos y dignidad.
- Se garantizará la protección del bienestar de la persona.

Por otro lado, de acuerdo a el artículo 11 de la Resolución No 008430 de 1993, la clasificación de esta investigación fue de riesgo mínimo, por tratarse de un estudio prospectivo que empleó el registro de datos a través de un procedimiento común que incluye; la evaluación clínica del participante y la recolección de muestra de orina espontánea.

Esta investigación pasó por un proceso de autorización por parte del Comité Científico y Comité de Ética de la Universidad Icesi, el cual fue aprobado.

2.4.2 CONVOCATORIA DE LOS VOLUNTARIOS

Para cada grupo del estudio se hicieron convocatorias en diferentes lugares, de la siguiente manera:

Grupo consumidor de infusión de coca: se convocaron personas del círculo social, conocidas y familiares de los integrantes del grupo de investigación.

Grupo de los cocainómanos: la convocatoria se realizó en centros de rehabilitación, buscando personas recién ingresadas a programas de desintoxicación. Además, también se buscaron personas referidas por familiares y círculo social.

Grupo control: se convocaron personas conocidas y familiares de los integrantes del grupo de investigación.

2.4.3 SELECCIÓN DE LOS VOLUNTARIOS

De acuerdo a la convocatoria de los voluntarios, los sujetos de estudio fueron seleccionados de acuerdo al cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión. Se organizaron en los grupos respectivos y se procedió a recolectar la muestra de orina de cada participante.

Como se mencionó anteriormente, se siguieron las consideraciones éticas de la *Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud* y se siguieron los principios básicos de Helsinki.

2.4.4 RETIRO DE LOS VOLUNTARIOS

La persona tuvo la autonomía y libertad de retirar su participación y consentimiento en cualquier momento durante el estudio sin ningún tipo de presión o coacción. En esta investigación en particular, ningún participante se retiró voluntariamente y todos decidieron participar hasta el final.

Se consideraba como retiro de voluntarios, a aquella persona que manifestara de forma oral o escrita no continuar con el proceso en cualquiera de las etapas del estudio. En el caso de que la persona se hubiera retirado después de haber consumido las hojas de *Erythroxylum coca*, se descartarían los resultados obtenidos, se eliminarían las muestras y se le hubiera proporcionado el seguimiento médico si se presentaba algún efecto adverso. Además, se respetaría la confidencialidad de la información privada que se alcanzó a recolectar.

2.5 METODOLOGÍA UTILIZADA

La metodología empleada se basó del estudio “*Hygrine and Cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing*” (C. Rubio S. Strano-Rossi, 2012).

Inicialmente se tomó aproximadamente 3 gramos de hojas de *Erythroxylum coca* obtenidas de cultivos del departamento del Cauca y 3 gramos de hoja de coca contenidas en bolsas de té. Estas, fueron alcalinizadas utilizando un tampón carbonato/bicarbonato a pH 9. Se dejaron en infusión durante 1 día y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con el reactivo éter etílico. Se extrajo la capa orgánica y se evaporó el solvente con el sistema Labconco.

Luego de que se evaporara totalmente la capa orgánica, se reconstituyó con 150 μ l de metanol, se agitó y posteriormente se transvasó el contenido a los viales. Por último, estos viales se llevaron al cromatógrafo de gases (Agilent 7890b) con detector de espectrometría de masas (Agilent 5975) para analizar los resultados.

Muestras de orina

A todas las muestras de orina se les realizó el mismo procedimiento. Estas, se obtuvieron de personas que voluntariamente querían participar en la investigación y que eran del círculo social de los investigadores. El grupo investigador se dirigió al lugar donde se encontraba el participante y a cada persona se le explicó claramente el motivo de su participación en el estudio. Posteriormente, se les entregó un consentimiento informado el cual debían leer detenidamente y firmarlo.

Cada participante se identificó con un código, por ejemplo: C1; C2, que corresponde a la primera y segunda muestra obtenida de los cocainómanos. Esto con el fin de proteger la privacidad del individuo.

Después que se les brindó esta información, se recolectaron las muestras de las siguiente manera:

Consumidores de hoja de coca

Inicialmente se preparó el té de coca con 2 sobres en una tasa de agua caliente y se dejó en infusión aproximadamente por 5 a 15 minutos para poder ser consumido.

Después, se le entregó a cada participante un recipiente anteriormente etiquetado, con la fecha y código para recolectar la muestra de orina. Se le indicó claramente a cada persona que los recipientes con la muestra se recogerían después de las 3 horas del consumo, máximo 4.

Las muestras obtenidas se congelaron a -20°C y así permanecieron hasta su uso.

Muestras de orina de consumidores de cocaína

Para recolectar las muestras de este tipo de consumidores, se contactaron varias fundaciones y centros de rehabilitación para encontrar personas que recientemente ingresaban a las organizaciones y que llevaban pocos días después de su último consumo. Con esta información, se podía determinar los candidatos correctos para el estudio que cumplieran con los criterios de inclusión, debido a que la última ingestión de cocaína no podía sobrepasar de 4 días.

Otras muestras de cocainómanos se obtuvieron por medio de personas cercanas que conocían este tipo de consumidores y que voluntariamente querían participar en la investigación.

Es importante aclarar que todas las personas pertenecientes a este grupo estaban totalmente conscientes de la información que se les estaba proporcionando. Sin embargo, no todos los candidatos aportaron información personal en el consentimiento informado como nombre y número de identificación, debido a las razones que se mencionaron anteriormente.

Muestras blanco

Este tipo de muestras de orina pertenece a las personas no consumidoras, es decir, personas que no consumieron ni cocaína procesada ni hoja de coca. También se les ofreció toda la información pertinente al estudio y firmaron el consentimiento informado.

Procedimiento de las muestras

Las muestras recolectadas de los grupos anteriormente mencionados se mantuvieron congeladas hasta su uso. Se consiguieron 10 muestras de consumidores de *Erythroxylum coca* y no consumidores y 11 muestras de cocainómanos.

Se tomó 10 ml de cada muestra y se adicionaron a un tubo cónico. Se añadió 5 ml de buffer carbonato-bicarbonato a pH 9, generando un total de 15 ml de volumen. Se agitó aproximadamente 30 minutos manualmente y con agitador vortex.

Posteriormente, se separaron los 15 ml en 3 tubos cónicos con 5 ml cada uno, para analizar cada muestra por triplicado. Después, se le adicionó a cada tubo 3 ml del reactivo éter etílico con agitación constante durante 30 minutos manualmente.

Luego, de cada tubo se tomaron 2 ml de la fase orgánica y se adicionaron a otro tubo cónico vacío. Estos tubos se llevaron al sistema RapidVap hasta que se evaporara completamente el solvente orgánico.

Posteriormente, se adicionó 150µl de metanol, se agitó y luego, ese mismo volumen se adicionó a los viales. Posteriormente, las muestras se analizaron en el cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas.

Estas muestras de orina se procesaron en el laboratorio 202L de la Universidad Icesi. Este lugar, cuenta con un sistema de extracción y ventilación, balanzas, sonicador, espectrofotómetro UV acoplado a un computador, rotaevaporadores, entre otros equipos, con su respectiva ficha de funcionamiento. Además, posee instalaciones y medidas de seguridad que evitan accidentes y hay una correcta clasificación de los desechos de acuerdo a los riesgos químicos y biológicos con sus respectivos recipientes. En este estudio, se empleó principalmente en cuanto a equipos, la cabina de bioseguridad y el sistema Rapidvap.

Las muestras procesadas se analizaron en un cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas facilitado por el Instituto Nacional de Medicina Legal seccional Cali que cuenta con un cuarto específico de varios de estos equipos con instalaciones de perfecto funcionamiento para análisis de estupefacientes.

2.5.1 CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

2.5.1.1 TIPO DE DISEÑO

Tipo descriptivo

2.5.1.2 UNIVERSO

La población de consumidores de la hoja de coca en presentación de té y consumidores de cocaína procesada en la ciudad de Cali.

2.5.1.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se tomó una muestra significativa que represente la totalidad de la población y que permita estudiar o determinar sus características. Para esto, se recolectaron 31 muestras en total de todos los sujetos de estudio: 10 de consumidores de hoja de *Erythroxylum coca*, 10 de no consumidores y 11 de consumidores de cocaína procesada. A todos estos grupos se les realizó un análisis por triplicado y cada muestra se revisó con tres bibliotecas especializadas: NIST8.0, NIST11.L y Wiley ver 8.

Las personas elegidas debían ser mayores de edad y debían cumplir con los criterios de inclusión.

Por tratarse de un estudio bioanalítico de tipo descriptivo en el cual prima la identificación de biomarcadores diferenciales, se afirma que es aceptable un muestreo de 5 individuos de las mismas características y que de cada muestra se realice un análisis por triplicado para que el resultado sea reproducible. Sin embargo, para reforzar la validez del estudio se recolectaron 31 muestras en total que se dividen en tres grupos: grupo P (consumidores del té), grupo C (consumidores de cocaína) y grupo N (no consumidores), como se puede observar a continuación en la imagen 11:

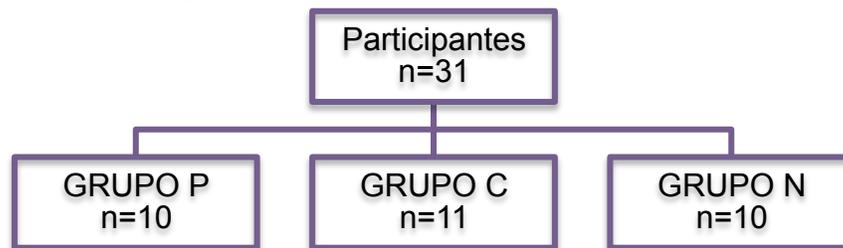


Imagen 11. Distribución de los grupos de estudio.

2.5.1.4 UNIDAD DE OBSERVACIÓN

1. **Grupo de consumidores de hoja de coca:** Individuos mayores de edad que consuman la hoja de coca de manera tradicional, terapéutica o que acepten ingerir la infusión de té. Sin comorbilidades y sin uso de medicamentos farmacológicos que interfiera con la observación de los resultados.
2. **Grupo de consumidores de cocaína procesada:** Individuos mayores de edad que consuman habitualmente cocaína y que su último consumo no exceda los 4 días.
3. **Grupo control:** Individuos mayores de edad, sin comorbilidades y sin uso de medicamentos farmacológicos que interfieran con la observación de los resultados. Además, sin antecedentes de consumo de cocaína o de hierbas medicinales que incluyan la hoja de coca.

2.5.1.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Mujeres y hombres mayores de edad.
- Personas que no utilicen medicamentos farmacológicos que interfiera la lectura correcta de los resultados.

- Personas que tengan disponibilidad del tiempo requerido, para la recolección de las muestras de orina.

2.5.1.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Mujeres embarazadas.
- Uso de medicamentos farmacológicos.
- Sujeto que en valoración médica se encuentre en fase de intoxicación aguda por cocaína con incapacidad de tomar de decisiones.
- Último consumo mayor a 4 días, para consumidores de cocaína.
- Último consumo mayor a 24 horas, para consumidores de hoja de coca.

2.5.1.7 DEFINICIÓN Y MEDICIÓN DE VARIABLES INDEPENDIENTES

Edad, sexo, etnia, vivienda actual, teléfono de contacto, consumo de hoja de coca, consumo de cocaína procesada, consumo de sustancias psicoactivas, tiempo de consumo, patologías.

2.5.1.8 DEFINICIÓN Y MEDICIÓN DE VARIABLES DEPENDIENTES

Como variables dependientes se definen la presencia o ausencia de biomarcadores candidatos.

2.5.1.9 PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS

Se creó una base de datos en Microsoft Excel en donde se encuentran las moléculas encontradas en los extractos de la hoja de coca provenientes de cultivos y del té. Además, se compararon estos compuestos con las muestras de orina de todos los consumidores determinando la presencia y la ausencia. La información de las variables dependientes de cada sujeto de estudio con su respectivo código y el análisis estadístico de los biomarcadores candidatos se realizaron aplicando la prueba de χ^2 cuadrado.

2.5.1.10 MÉTODOS O TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN

Se recolectó la muestra de orina de los participantes aptos para el estudio, en un recipiente plástico de polipropileno de 40 ml, que fue tomada por el mismo voluntario. Estas muestras se mantuvieron a -20°C hasta su uso y se identificaron de acuerdo a como se describe en la metodología. Para realizar el respectivo análisis, se empleó un muestreo propositivo donde se integra los sujetos que cumplan con todos los criterios de inclusión.

2.5.1.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Por tratarse de un análisis cualitativo, se utilizó como estadístico la prueba χ^2 cuadrado de acuerdo a las variables del estudio y las moléculas obtenidas como posibles biomarcadores.

La variable resultado es dicotómica, lo cual permiten evaluar la ausencia o presencia de las moléculas en las muestras.

2.5.1.12 SEGOS POTENCIALES

- Falsedad en la información aportada por el participante.
- Fallas de calibración y mantenimiento de los equipos de análisis.
- Descomposición de la muestra.

2.5.1.13 POSIBLES EFECTOS ADVERSOS

Hasta el momento no se ha reportado que el consumo de hoja de *Erythroxylum coca* presente efectos adversos.

2.5.1.14 CONDICIONES DE ENSAYO

Las muestras de orina se recogieron en recipientes plásticos limpios, después de la valoración médica y la firma del consentimiento informado.

En todos los casos, dichas muestras se congelaron inmediatamente después de la recolección y así se mantuvieron hasta su procesamiento. El sobrante de las muestras es guardado en el congelador nuevamente hasta su uso posterior.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Se empleó un cromatógrafo de gases Agilent 7890b y un detector de espectrometría de masas Agilent 5975. La columna cromatografía es capilar, HP 5% Phenyl Methyl Silox, con las siguientes dimensiones 30 m x 250 μm x 0.25 μm . El caudal del gas portador fué de 1mL/min a una presión de 9,954 Psi y la temperatura máxima del horno es de 325°C con un tiempo de equilibrado de 0,5 min.

En cuanto al detector de masas opera por impacto electrónico y la adquisición de iones se encuentra entre 50 m/z a 800 m/z.

2.5.1.15 REALIZACIÓN DEL ENSAYO

Las personas que decidieron participar se ubicaron en los grupos a estudiar, que se encuentran claramente definidos en el consentimiento informado. A partir de esta posición, tomaron su rol en el proceso en donde siguieron correctamente el procedimiento descrito.

2.5.1.16 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se tomaron las muestras de orina hasta un tiempo máximo de 4 horas para los consumidores de la hoja de coca y 4 días para los consumidores de cocaína procesada. Cada muestra recolectada se analizó por triplicado.

2.5.1.17 MATRIZ DE MARCO LÓGICO

Tabla 2. Matriz de marco lógico planteado

| Objetivo general | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Identificar al menos dos biomarcadores de tipo alcaloidal, que permitan diferenciar entre el consumo de cocaína como droga de abuso y el consumo de hoja de <i>Erythroxylum coca</i> . | | | |
| | Actividades | Supuestos | Indicador |
| Objetivo específico 1. Determinar en muestras de orina los posibles compuestos químicos de tipo alcaloidal de <i>Erythroxylum coca</i> que se encuentren en los consumidores de hojas o té de coca y en cocainómanos. | Recolección de información bibliográfica Implementación del protocolo para el comité de ética y consentimiento informado. Obtención de muestras de orina de personas consumidoras de hoja <i>E. coca</i> , cocainómanos y muestras blanco. Preparación de muestras (extracción líquido-líquido) Análisis de las muestras utilizando | Aprobación de la propuesta por el Comité Científico. Aprobación del comité de ética de la Universidad Icesi y el Instituto Nacional de Medicina Legal. Disposición de las muestras de orina de las personas consumidoras de <i>E. coca</i> y cocainómanos. Disponibilidad de equipos y materiales necesarios para la preparación de las muestras y su análisis | Obtener un listado de los alcaloides y compuestos provenientes de las muestras de orina de los cocainómanos y de los que consumen hoja de <i>E. coca</i> . |

| | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Cromatografía de gases y espectrómetro de masas. | | |
| <p>Objetivo específico 2. Identificar posibles biomarcadores en los compuestos extraídos.</p> | Identificación de biomarcadores candidatos. | Disponibilidad de equipos. Interferencias de la matriz que no permitan observar los tiempos de retención de Higrina y Cuscohigrina y por lo tanto, no se pueda hacer la diferenciación entre cocainómano y consumidor de <i>E. coca</i> . | Obtener un cromatograma donde se diferencien los tiempos de retención de las moléculas obtenidas. Determinar espectros de fragmentación y patrones de masa de las moléculas analizadas. |
| <p>Objetivo específico 3. Comprobar si los alcaloides Higrina y Cuscohigrina reportados en la literatura, están presentes en las muestras y confirman que pueden ser biomarcadores para la diferenciación de un consumidor de hoja de <i>Erythroxylum coca</i> y un cocainómano.</p> | <p>Análisis estadístico cualitativo de las variables del estudio y comparación con los datos teóricos.</p> <p>Presentación del Informe final.</p> | No se observa claramente los tiempos de retención y fragmentos de masa de los alcaloides candidatos como biomarcadores. | Resultados del análisis estadístico cualitativo entre las variables del estudio y el tamaño de la muestra. |

2.6 RESULTADOS

Para la identificación de los biomarcadores se analizaron los extractos mediante la técnica de cromatografía de gases con espectrometría de masas. En el análisis de los extractos del té de coca, se encontraron varias moléculas químicas que entre las principales se encuentran diversos antioxidantes, ácidos grasos y moléculas que dan aroma a la planta, entre otras. También, se encontraron alcaloides, entre los cuales se encuentra la cocaína y sus principales metabolitos como cinamilcocaína, ecgonina metil éster y ecgonidina metil éster.

A continuación en la tabla 3, se encuentran los principales alcaloides y componentes de interés con los datos obtenidos del tiempo de retención y los patrones de masa característicos de acuerdo a la literatura.

Tabla 3. Moléculas encontradas en el té de coca junto con sus tiempos de retención y los patrones de masa.

| TÉ DE COCA | Tiempo de retención (Min) | Patrones de masa (m/z) | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------------|---------------------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 106 | 122 | 138 | 152 | 166 | 181 | | | | | |
| Ecgonidina, metil éster | 9,32 | 106 | 122 | 138 | 152 | 166 | 181 | | | | | |
| Ecgonina metil éster | 10,48 | 55 | 82 | 96 | 112 | 140 | 168 | 169 | | | | |
| Ácido tetradecanoico | 13,60 | 60 | 73 | 85 | 97 | 115 | 129 | 143 | 171 | 185 | 199 | 228 |
| 10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno | 16,48 | 55 | 73 | 97 | 105 | 115 | 129 | 143 | 157 | 199 | 227 | 242 |
| Ácido octadecanoico | 17,48 | 60 | 73 | 83 | 115 | 129 | 171 | 185 | 199 | 241 | 255 | 284 |
| Cocaína | 18,30 | 51 | 68 | 82 | 94 | 105 | 122 | 152 | 182 | 198 | 272 | 303 |
| Cinamilcocaína | 21,77 | 55 | 82 | 96 | 131 | 152 | 168 | 182 | 198 | 238 | 329 | |
| 1H-Azepina, hexahidro-1-(1-oxo-9-octadecenil)- | 24,10 | 55 | 70 | 83 | 98 | 126 | 141 | 154 | 210 | 264 | 363 | |

Las imágenes mostradas a continuación pertenecen a los espectros de los fragmentos de masa obtenidos de las moléculas mencionadas en la tabla 3. En el lado izquierdo para el lector, se encuentra el espectro teórico junto con la molécula y en el lado derecho se ubica el espectro obtenido experimentalmente que contiene en su parte inferior el tiempo de retención. Debajo de estas imágenes, se muestra la comparación entre estos dos espectros anteriormente mencionados. El que se encuentra en color rojo, el superior, pertenece al espectro experimental y el de color azul, el inferior, corresponde al espectro teórico.

Ecgonidina metil éster

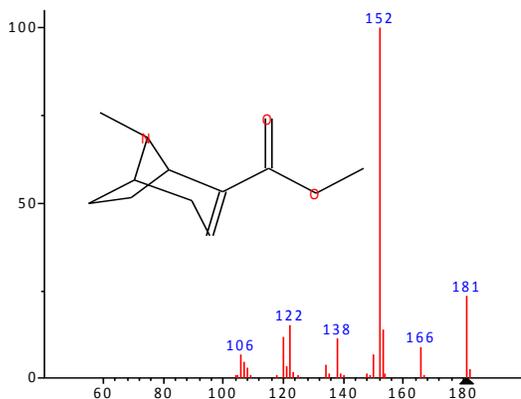


Imagen 12. Espectro teórico de fragmentación de masa de Ecgonidina metil éster.

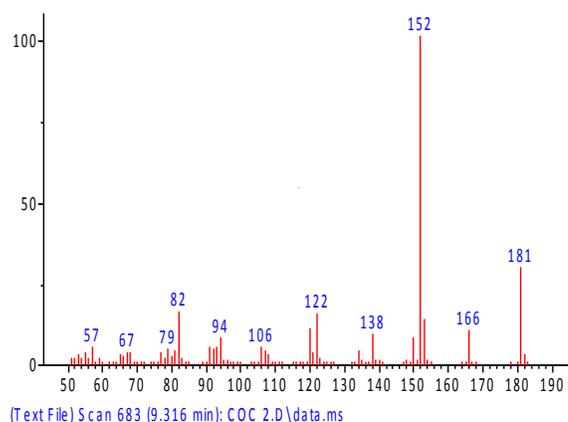


Imagen 13. Espectro experimental de fragmentación de masa de Ecgonidina metil éster.

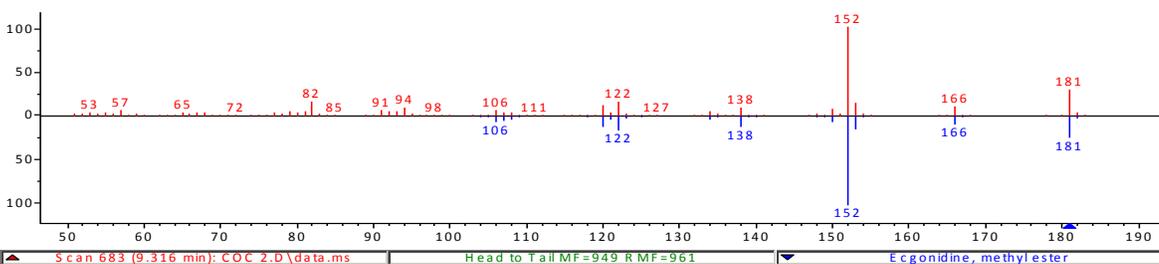


Imagen 14. Comparación de los espectros de masa obtenidos de Ecgonidina metil éster.

Cocaína

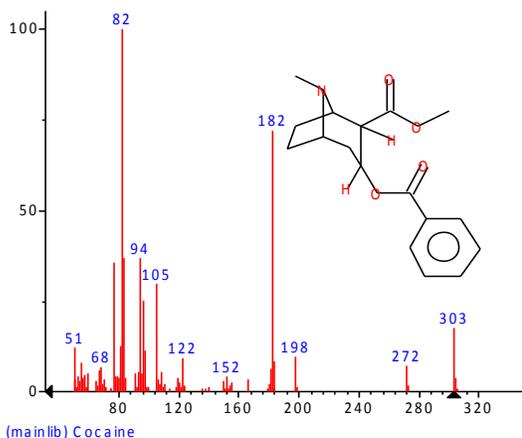


Imagen 15. Espectro teórico de fragmentación de masa de cocaína.

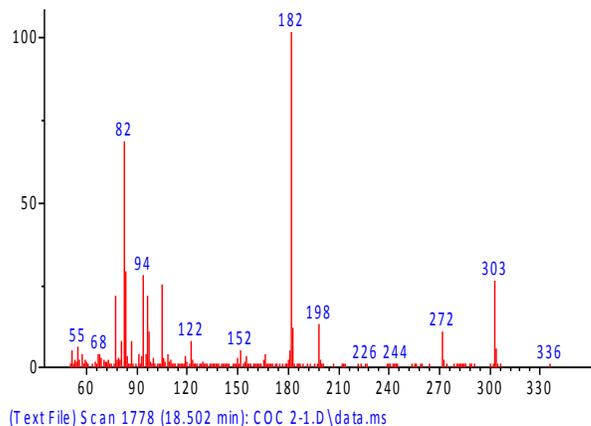


Imagen 16. Espectro experimental de fragmentación de masa de cocaína.

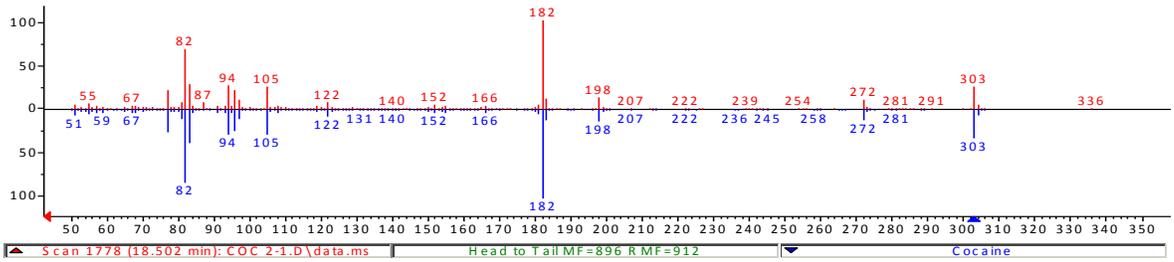


Imagen 17. Comparación de los espectros de masa obtenidos de cocaína.

Cinamoilcocaína

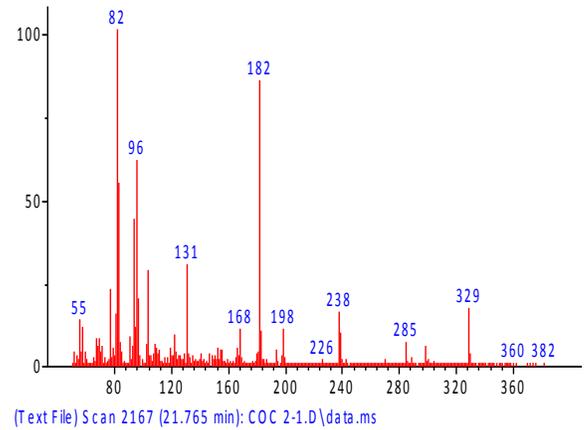
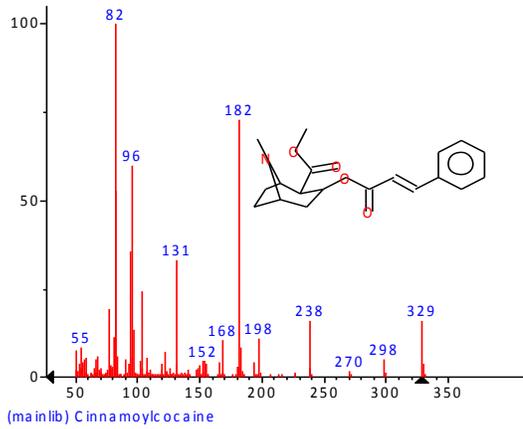


Imagen 18. Espectro teórico de fragmentación de masa de cinamilcocaína.

Imagen 19. Espectro experimental de fragmentación de masa de cinamilcocaína.

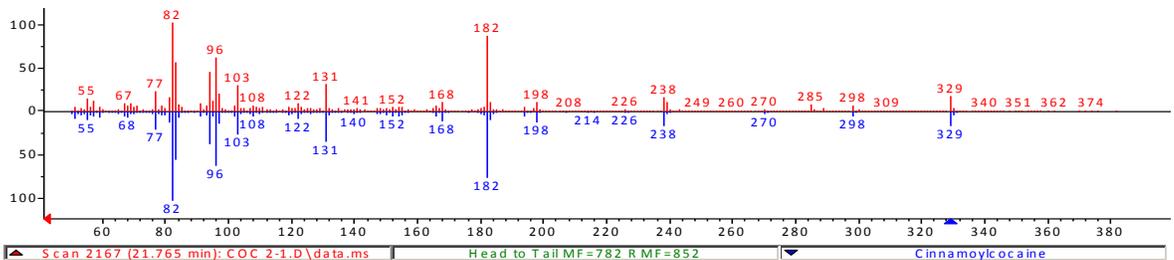
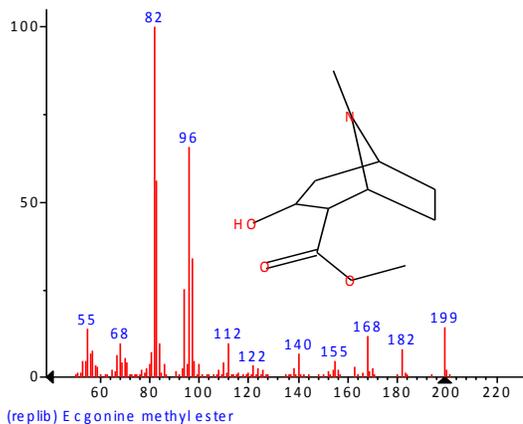


Imagen 20. Comparación de los espectros de masa obtenidos de cinamilcocaína.

Ecgonina metil éster



(replib) Ecgonine methyl ester

Imagen 21. Espectro teórico de fragmentación de masa de ecgonina metil éster.

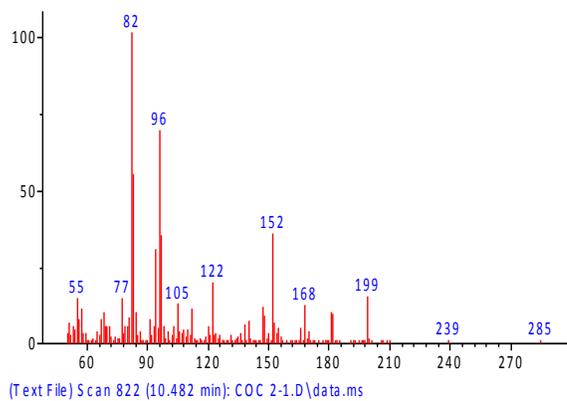


Imagen 22. Espectro experimental de fragmentación de masa de ecgonina metil éster.

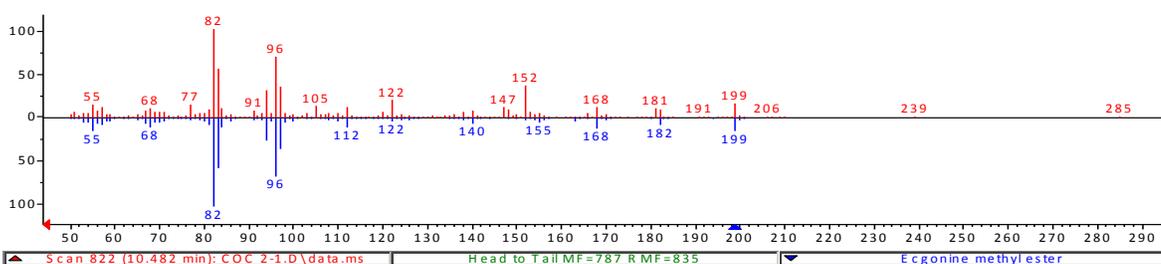
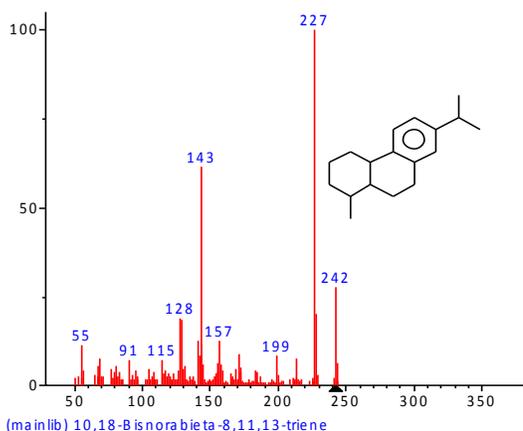


Imagen 23. Comparación de los espectros de masa obtenidos de ecgonina metil éster.

10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno



(mainlib) 10,18-Bisnorabieta-8,11,13-trieno

Imagen 24. Espectro teórico de fragmentación de masa de 10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno.

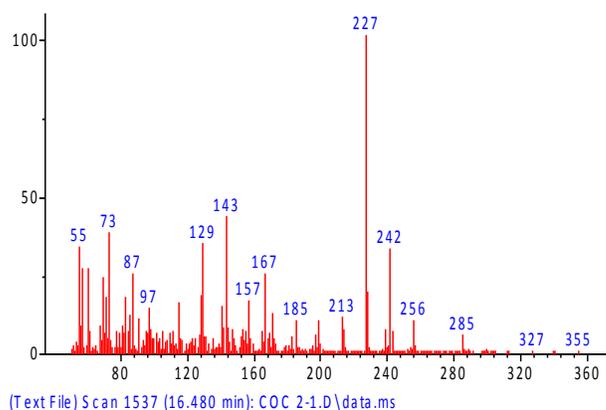


Imagen 25. Espectro experimental de fragmentación de masa de 10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno.

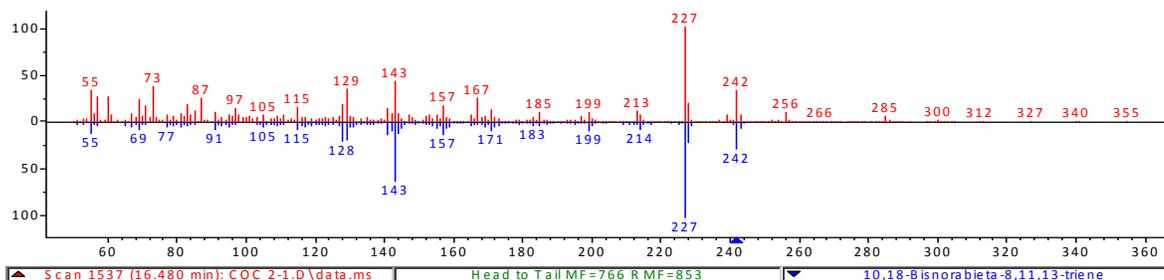


Imagen 26. Comparación de los espectros de masa obtenidos de 10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno.

Ácido octadecanoico

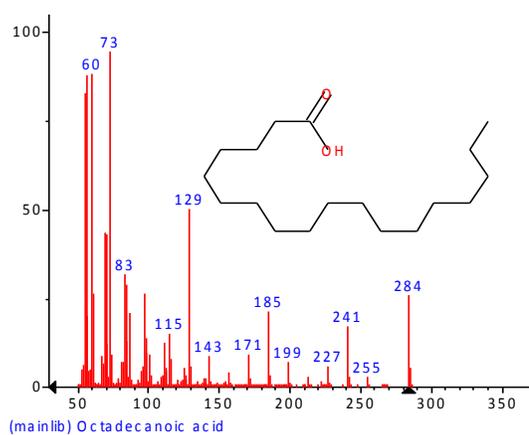


Imagen 27. Espectro teórico de fragmentación de masa del ácido octadecanoico.

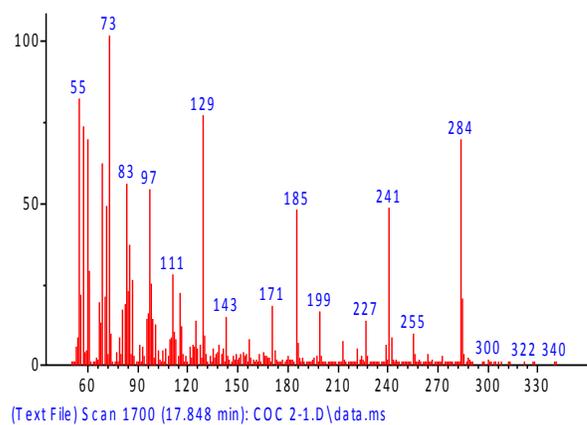


Imagen 28. Espectro experimental de fragmentación de masa del ácido octadecanoico.

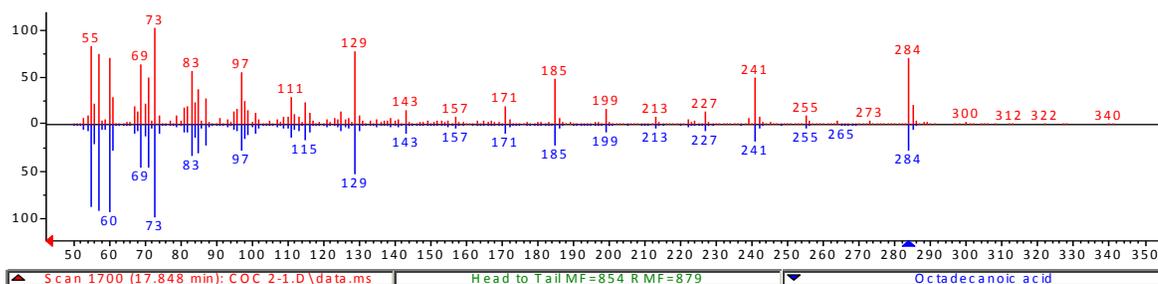
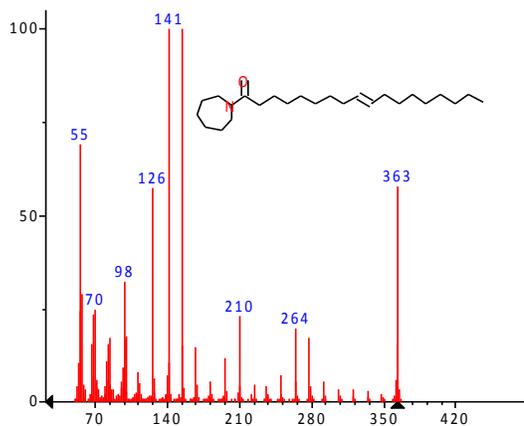


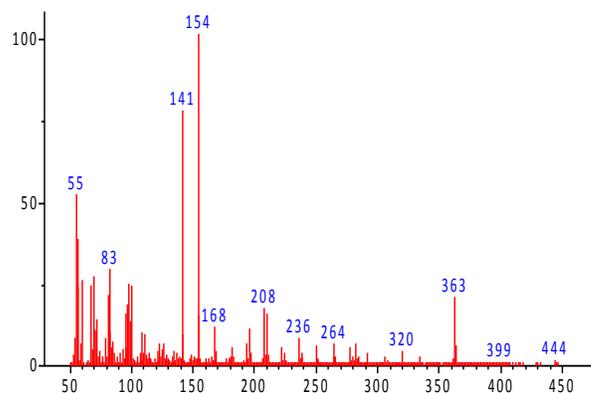
Imagen 29. Comparación de los espectros de masa obtenidos del ácido octadecanoico.

1H-Azepina, hexahidro-1-(1-oxo-9-octadecenil)-



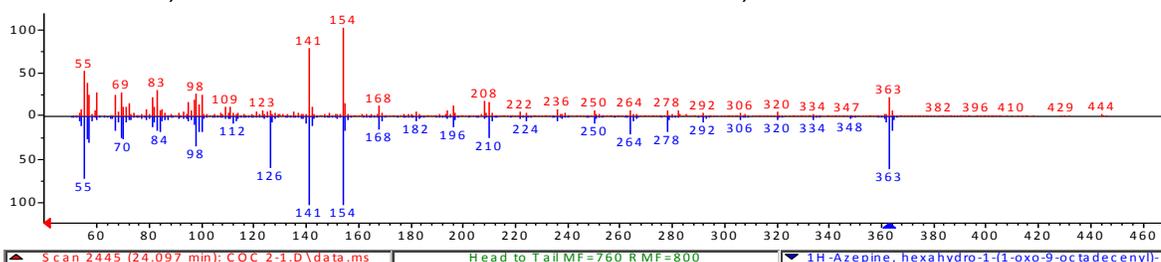
(mainlib) 1H-Azepina, hexahidro-1-(1-oxo-9-octadecenil)-

Imagen 30. Espectro teórico de fragmentación de masa de 1H-Azepina, hexahidro-1-(1-oxo-9-octadecenil)-.



(Text File) Scan 2445 (24.097 min): COC 2-1.D\data.ms

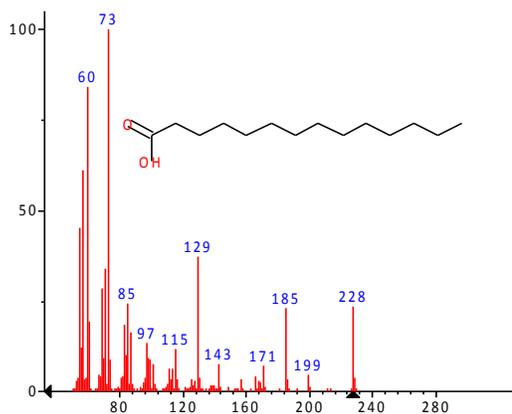
Imagen 31. Espectro experimental de fragmentación de masa de 1H-Azepina, hexahidro-1-(1-oxo-9-octadecenil)-.



Scan 2445 (24.097 min): COC 2-1.D\data.ms Head to Tail MF=760 RMF=800 1H-Azepina, hexahidro-1-(1-oxo-9-octadecenil)-

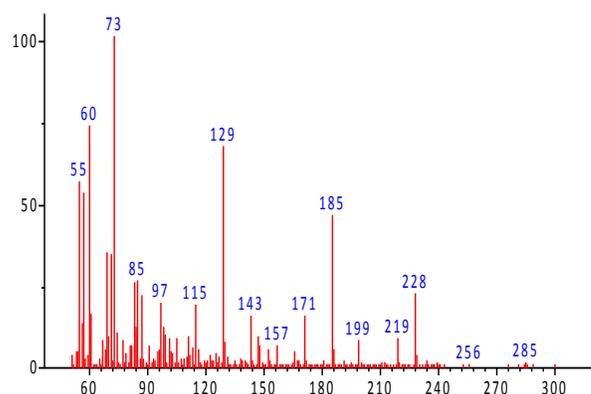
Imagen 32. Comparación de los espectros de masa obtenidos de 1H-Azepina, hexahidro-1-(1-oxo-9-octadecenil)-.

Ácido tetradecanoico



(replib) Tetradecanoic acid

Imagen 33. Espectro teórico de fragmentación de masa del ácido tetradecanoico.



(Text File) Scan 1194 (13.603 min): COC 2-1.D\data.ms

Imagen 34. Espectro experimental de fragmentación de masa del ácido tetradecanoico.

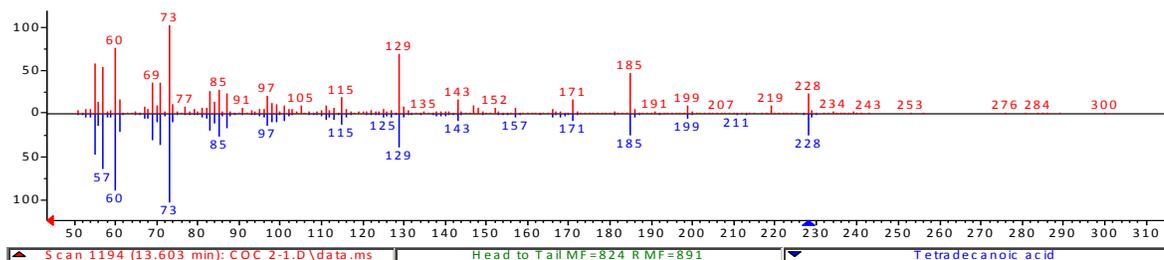


Imagen 35. Comparación de los espectros de masa obtenidos del ácido tetradecanoico.

A continuación se muestra el cromatograma donde se obtuvieron los diferentes tiempos de retención.

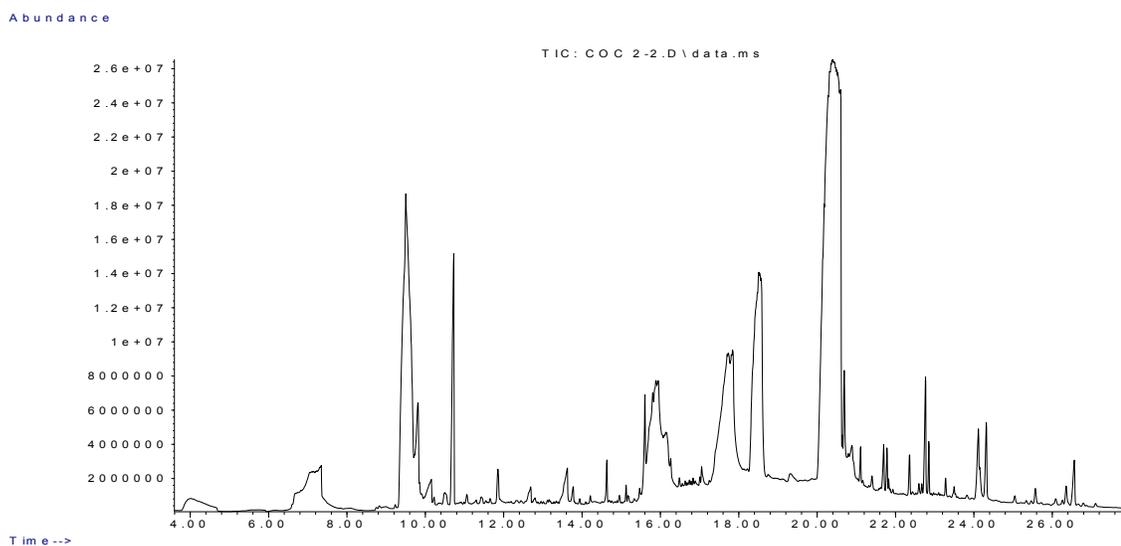


Imagen 36. Cromatograma con los tiempos de retención de las moléculas obtenidas en los extractos de té de coca.

En cuanto a las hojas de coca provenientes de los cultivos del departamento del Cauca, se encontraron muchos de los componentes presentes en la infusión. Sin embargo, se encontraron otros alcaloides adicionales como, trans-cinamilcocaina, tropacocaina y el principal metabolito de la cocaína benzoilecgonina.

A continuación en la tabla 4, se encuentran los principales alcaloides y componentes de interés encontrados con los datos obtenidos del tiempo de retención y patrones de masa.

Tabla 4. Moléculas analizadas en las hojas de coca con sus tiempos de retención y los patrones de masa.

| HOJA DE COCA | Tiempo de retención (Min) | Patrones de masa (m/z) | | | | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ecgonidina, metil éster | 9,367 | 106 | 122 | 138 | 152 | 166 | 181 | | | | |
| Egonina metil éster | 10,466 | 55 | 68 | 82 | 96 | 112 | 140 | 155 | 168 | 182 | 199 |
| Trans-cinamilcocaína | 14,484 | 57 | 82 | 94 | 131 | 168 | 182 | 198 | 239 | 268 | 300 |
| Benzoilecgonina | 15,683 | 67 | 82 | 105 | 124 | 140 | 165 | 185 | 285 | 289 | |
| Tropacocaína | 15,843 | 51 | 67 | 82 | 94 | 105 | 124 | 140 | 146 | 245 | |
| Cocaína | 18,502 | 51 | 82 | 94 | 122 | 152 | 182 | 198 | 259 | 272 | 303 |
| Cinnamoylcocaine | 20,498 | 55 | 82 | 96 | 131 | 168 | 182 | 198 | 238 | 298 | 329 |
| Cis-cinamilcocaína | 20,532 | 55 | 82 | 96 | 131 | 168 | 182 | 198 | 238 | 298 | 329 |

Las imágenes siguientes pertenecen a los espectros de los fragmentos de masa obtenidos de cada molécula mencionada en la tabla 4. Para recordar, en el lado izquierdo se encuentra el espectro teórico y en el lado derecho se ubica el espectro obtenido experimentalmente. En la figura inferior a estas imágenes, se muestra la comparación entre estos dos espectros anteriormente mencionados.

Ecgonidina metil éster

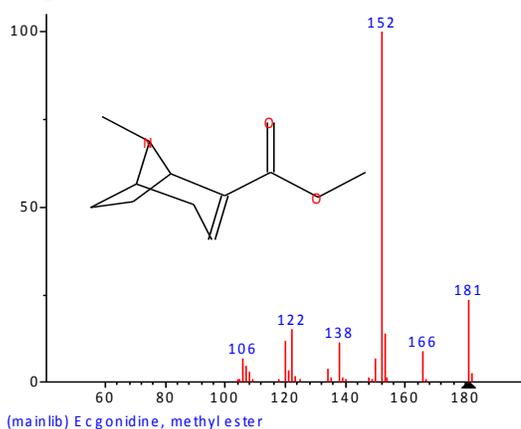


Imagen 37. Espectro teórico de fragmentación de masa de Ecgonidina metil éster.

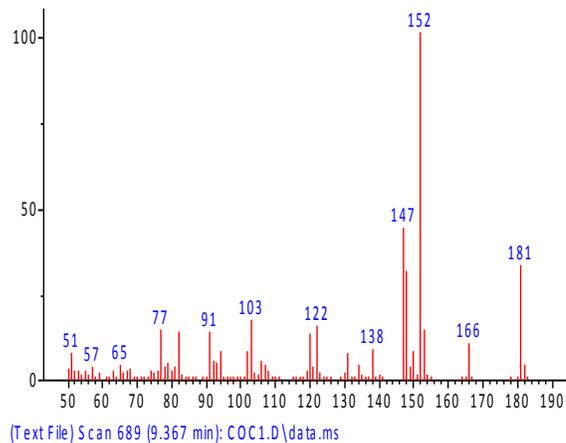


Imagen 38. Espectro experimental de fragmentación de masa de Ecgonidina metil éster.

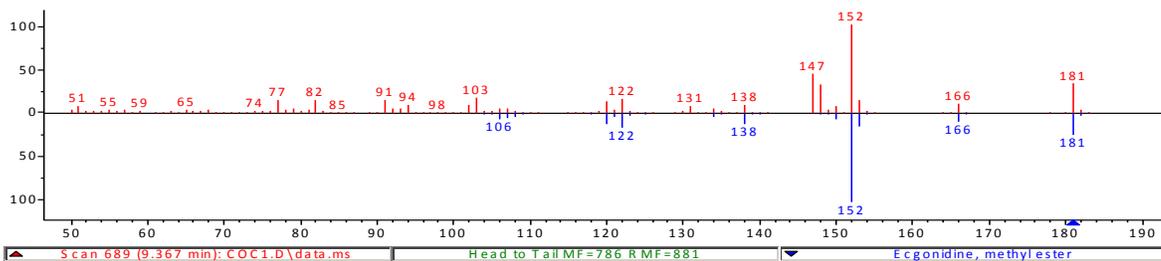


Imagen 39. Comparación de los espectros de masa obtenidos de ecgonidina metil éster.

Trans-cinamilcocaína

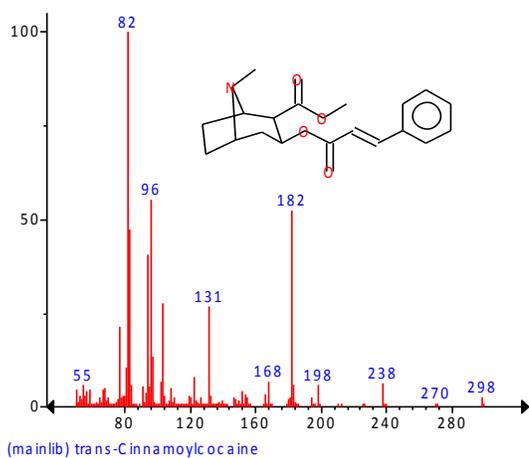


Imagen 40. Espectro teórico de fragmentación de masa de trans-cinamilcocaína.

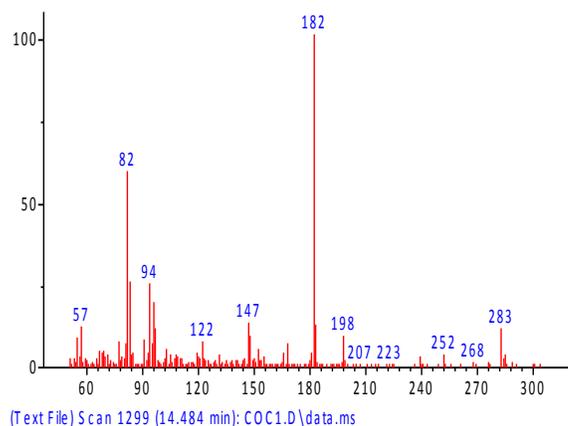


Imagen 41. Espectro experimental de fragmentación de masa de trans-cinamilcocaína.

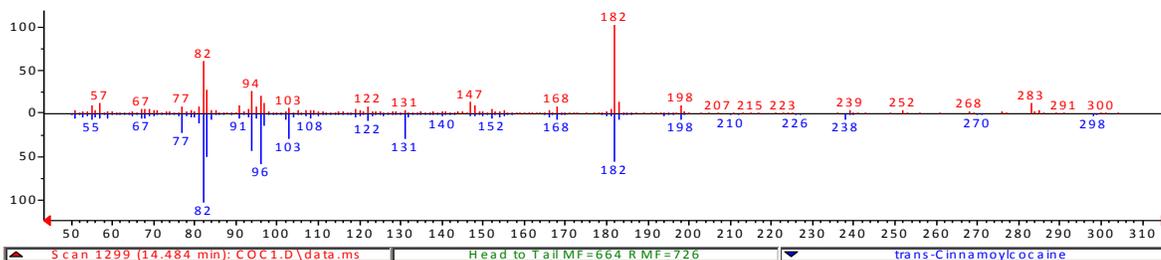
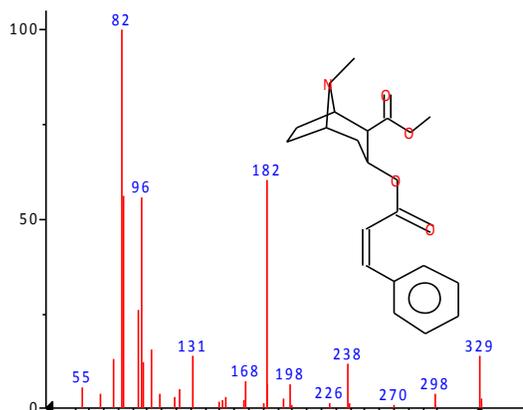


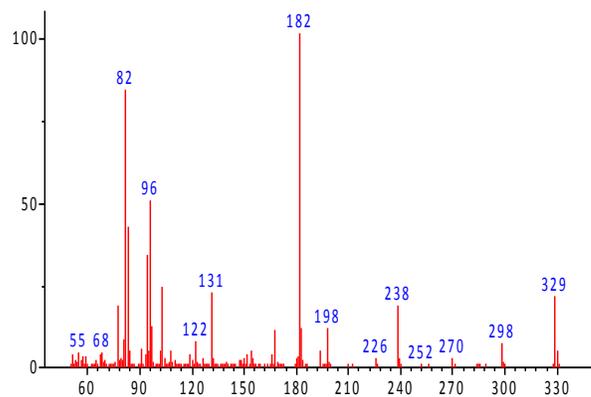
Imagen 42. Comparación de los espectros de masa obtenidos de trans-cinamilcocaína.

Cis-cinamilocaína



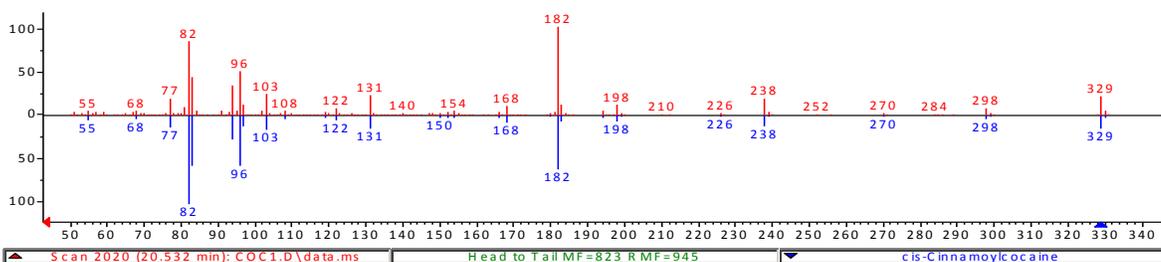
(mainlib) cis-Cinnamoylcocaine

Imagen 43. Espectro teórico de fragmentación de masa de cis-cinamilocaína.



(Text File) Scan 2020 (20.532 min): COC1.D\data.ms

Imagen 44. Espectro experimental de fragmentación de masa de cis-cinamilocaína.



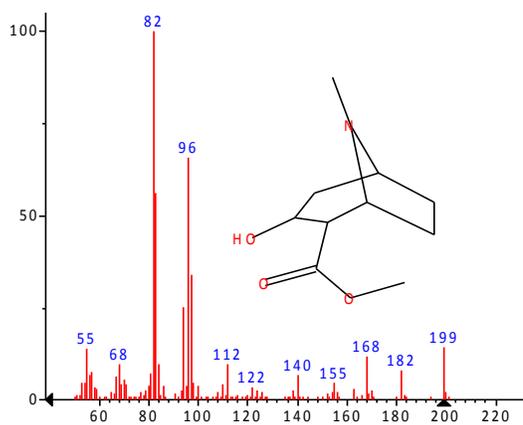
Scan 2020 (20.532 min): COC1.D\data.ms

Head to Tail MF=823 RMF=945

cis-Cinnamoylcocaine

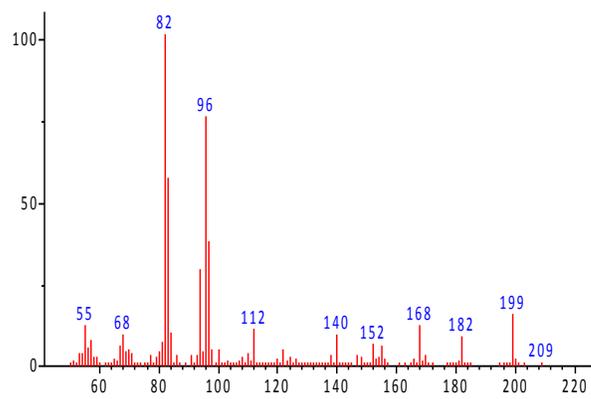
Imagen 45. Comparación de los espectros de masa obtenidos de cis-cinamilocaína.

Ecgonina metil éster



(replib) Ecgonine methylester

Imagen 46. Espectro teórico de fragmentación de masa de ecgonina metil éster.



(Text File) Scan 820 (10.466 min): COC1.D\data.ms

Imagen 47. Espectro experimental de fragmentación de masa de ecgonina metil éster.

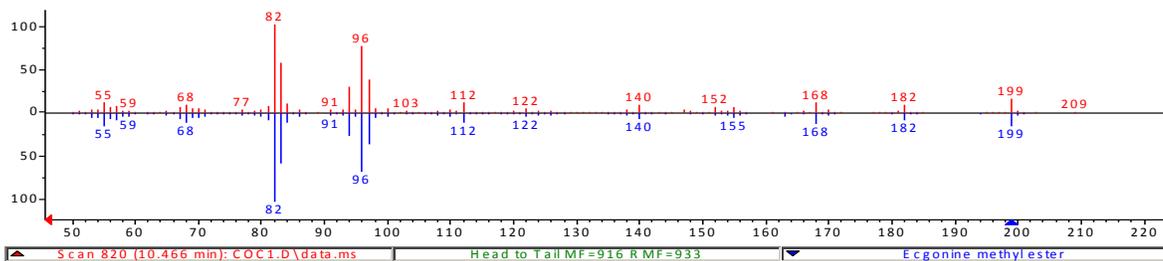


Imagen 48. Comparación de los espectros de masa obtenidos de ecgonina metil éster.

Cocaína

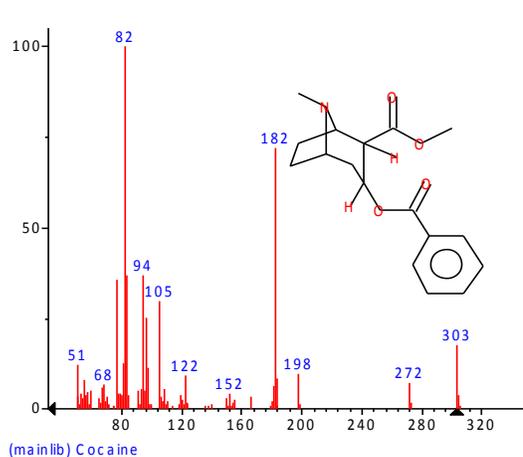


Imagen 49. Espectro teórico de fragmentación de masa de cocaína

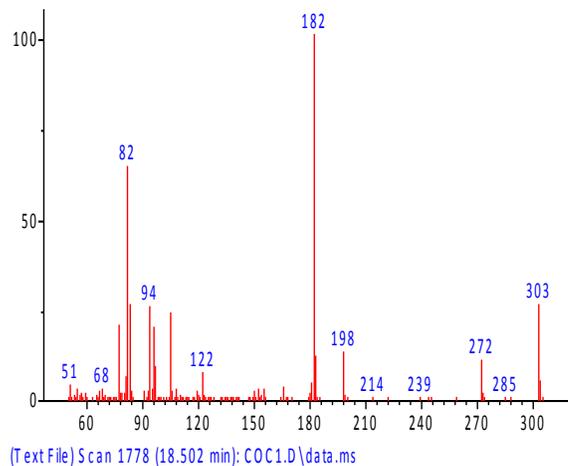


Imagen 50. Espectro experimental de fragmentación de masa de cocaína

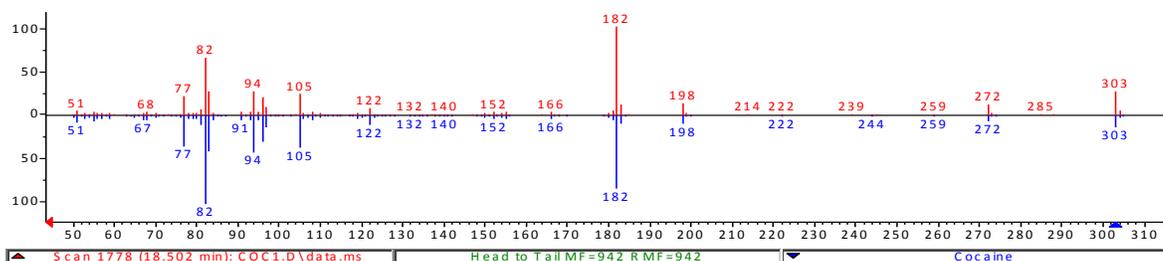


Imagen 51. Comparación de los espectros de masa obtenidos de cocaína.

Benzoilecgonina

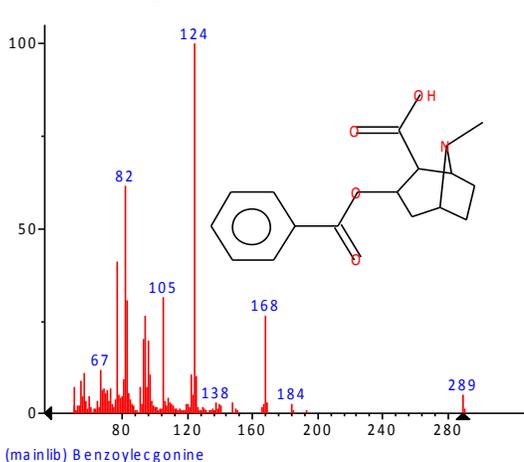


Imagen 52. Espectro teórico de fragmentación de masa de benzoilecgonina.

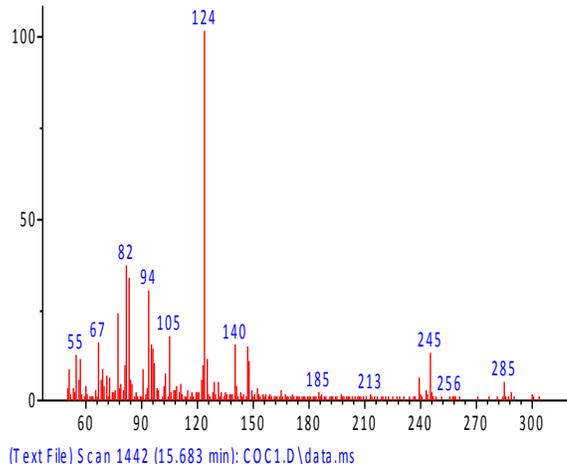


Imagen 53. Espectro experimental de fragmentación de masa de benzoilcocaína.

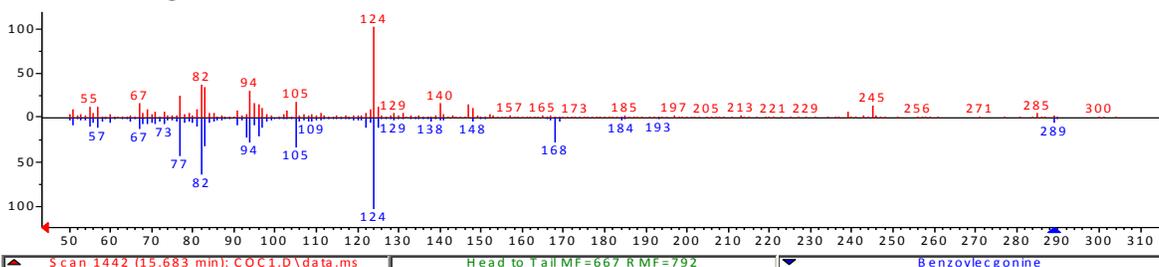


Imagen 54. Comparación de los espectros de masa obtenidos de benzoilecgonina.

Tropacocaína

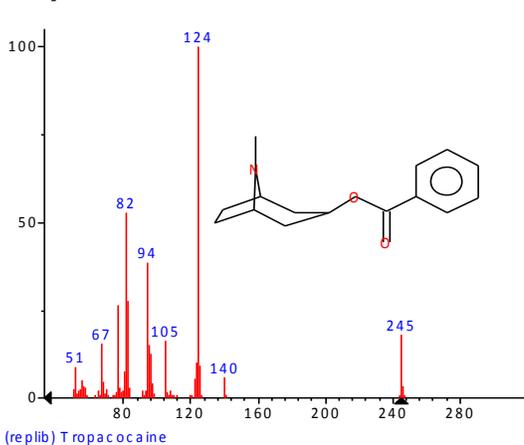


Imagen 55. Espectro teórico de fragmentación de masa de tropacocaína

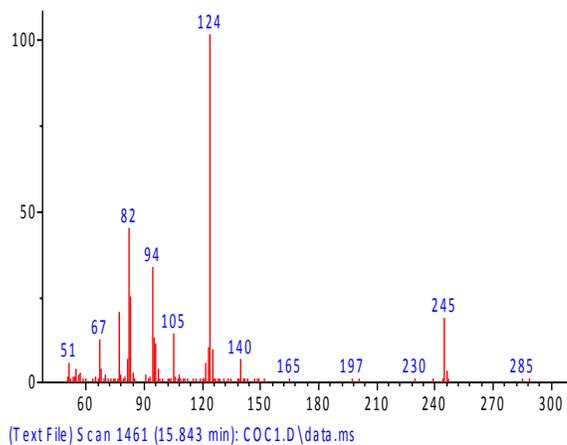


Imagen 56. Espectro experimental de fragmentación de masa de tropacocaína

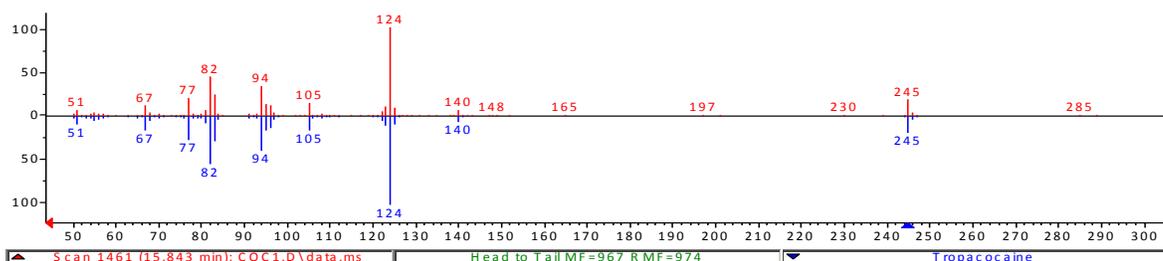


Imagen 57. Comparación de los espectros de masa obtenidos de tropacocaina

Cinamilcocaína

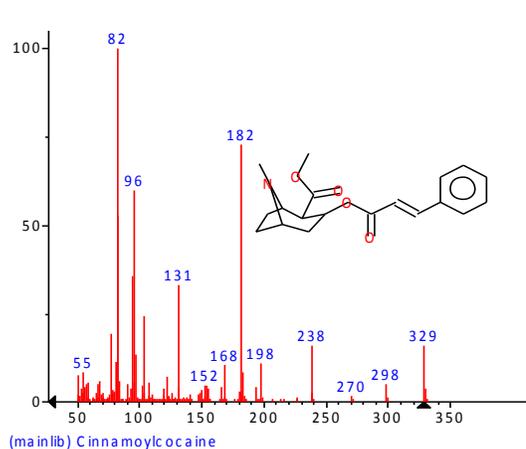


Imagen 58. Espectro teórico de fragmentación de masa de cinamilcocaína

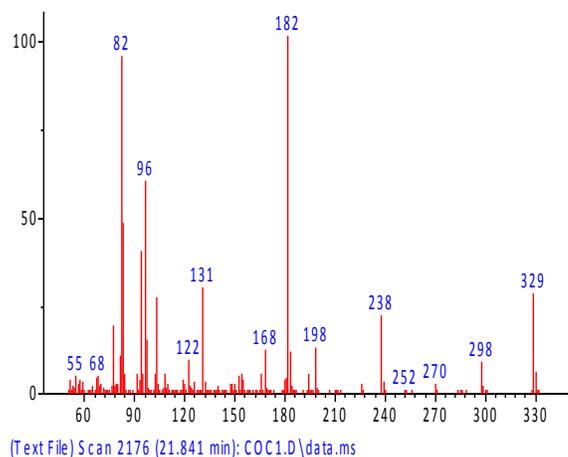


Imagen 59. Espectro experimental de fragmentación de masa de cinamilcocaína

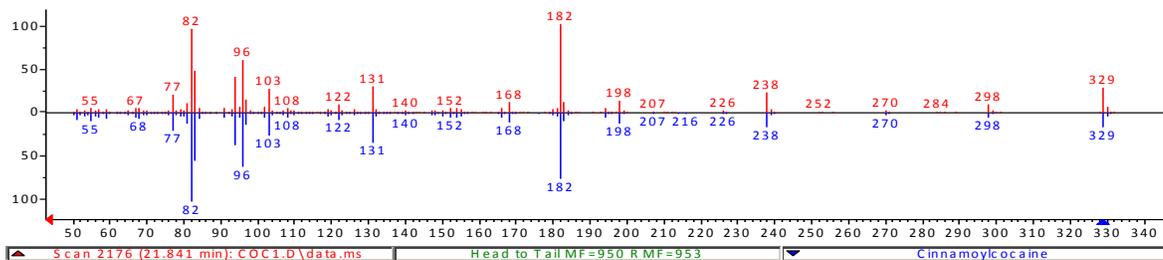


Imagen 60. Comparación de los espectros de masa obtenidos de cinamilcocaína.

A continuación, se muestra la posible molécula de higrina obtenida de las hojas de coca proveniente de cultivos con su respectivo tiempo de retención.

Higrina

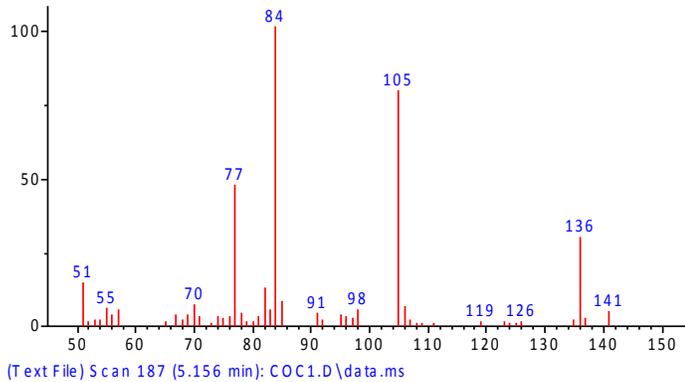


Imagen 61. Espectro teórico de fragmentación de masa de higrina

En la siguiente imagen se muestra el cromatograma obtenido de los tiempos de retención del extracto de hoja de coca.

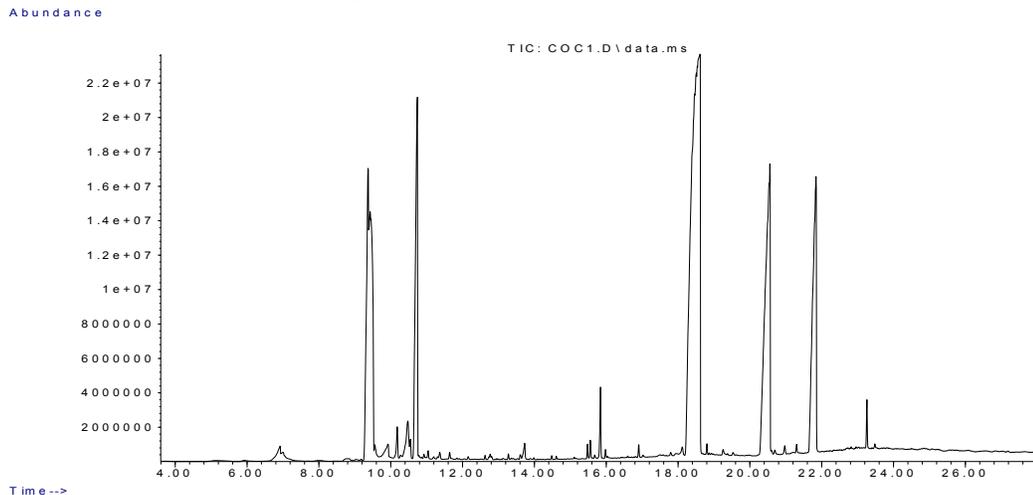


Imagen 62. Cromatograma de iones con los tiempos de retención de las moléculas obtenidas en las hojas de coca provenientes de cultivos.

Los resultados mencionados anteriormente se compararon con los obtenidos en las muestras de orina de cada participante. A continuación en la tabla 5, se muestra el resumen del análisis por triplicado de las moléculas observadas en los extractos de orina de los grupos de voluntarios. Para mayor información, todos los compuestos obtenidos en los extractos del té y las hojas de coca provenientes de cultivos se encuentran en la primera tabla 14 del anexo 1.

Tabla 5. Resultados de las moléculas encontradas en las muestras de orina para los grupos de estudio.

| MOLECULAS DEL EL TÉ DE COCA | GRUPOS DE ESTUDIO (FRECUENCIA) | | |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------|----------|
| | P (n=10) | C (n=11) | N (n=10) |
| Ecgonidine, methyl ester | 2 | 5 | 0 |
| Cocaine | 6 | 9 | 0 |
| Ecgonine methyl ester | 4 | 5 | 0 |
| Butylated hydroxytoluene | 10 | 10 | 10 |
| 5H-benzo(b)pyran-8-ol,2,3,5,5,8a-pentamethyl-6,7,8,8a-tetra | 0 | 1 | 0 |
| Tetradecanoic acid | 4 | 0 | 1 |
| Hexadecanoic acid, methyl ester | 10 | 11 | 10 |
| n.hexadecanoic acid | 8 | 4 | 1 |
| 10,18-bisnorabieta-8,11,13-triene | 8 | 0 | 0 |
| Octadecanoic acid | 7 | 1 | 0 |
| Phenol,2,2-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- | 1 | 0 | 0 |
| Cinnamoylcocaine | 0 | 2 | 0 |
| 1H-Azepine, hexahydro-1-(1-oxo-9-octadecenyl)- | 5 | 0 | 0 |
| Benzoic acid | 1 | 1 | 0 |
| p-Hydroxycinnamic acid, ethyl ester | 0 | 2 | 0 |
| | | | |

| MOLECULAS DE LA HOJA DE COCA | P (n=10) | C (n=11) | N (n=10) |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Benzoic acid | 1 | 1 | 0 |
| 2-propenoic acid, 3-phenyl-,methyl ester | 0 | 5 | 1 |
| Ecgonidine, methyl ester | 2 | 4 | 0 |
| Ecgonine methyl ester | 4 | 5 | 0 |
| Butylated hydroxytoluene | 10 | 10 | 10 |
| Benzene, 1,2,4,5-tetrakis(1-methylethyl)- | 2 | 4 | 0 |
| Trans-cinnamoylcocaine | 0 | 2 | 0 |
| Benzoyllecgonine | 0 | 2 | 0 |
| Tropacocaine | 0 | 1 | 0 |
| Cinnamoylcocaine | 0 | 2 | 0 |
| Benzamide,2-hydroxy-N-(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinyl)- | 0 | 0 | 0 |
| cocaine | 5 | 9 | 0 |
| Oxirane,2,2-[(1-methylethylidene)bis(4,1-phenyleneoxymethyl | 1 | 0 | 0 |
| 8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-ene-2-carboxylic acid, 8-methyl-,methyl ester, (1r,5s)- | 0 | 2 | 0 |
| 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one | 7 | 6 | 4 |
| Allopseudomethylecgonine | 1 | 0 | 0 |
| Cis-Cinnamoylcocaine | 0 | 2 | 0 |

A continuación se muestran los gráficos de la frecuencia de las moléculas encontradas en el té y las hojas de coca de acuerdo a los grupos de estudio.

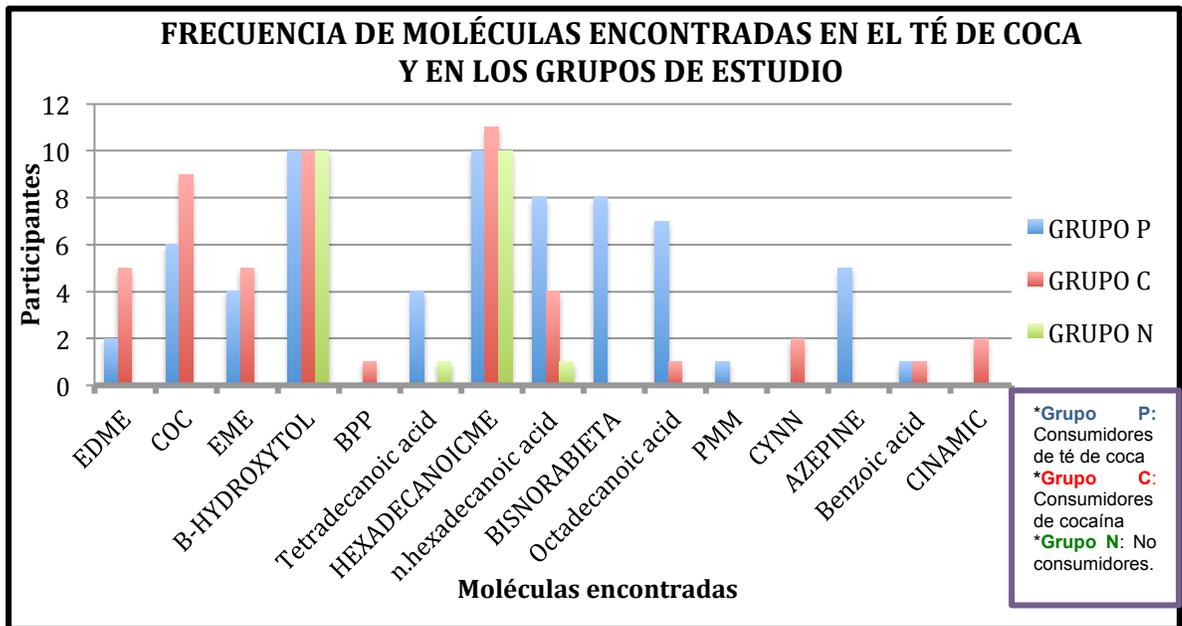


Imagen 63. Gráfico de frecuencia de moléculas encontradas en el té de coca y en los grupos de estudio.

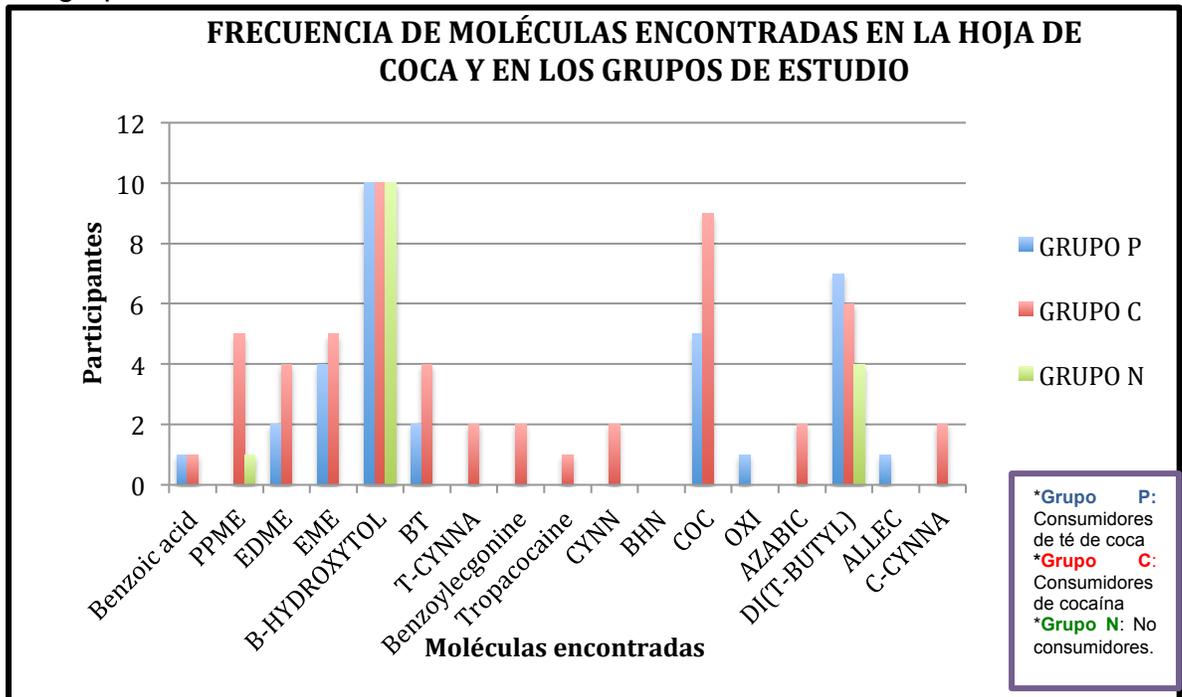


Imagen 64. Gráfico de frecuencia de moléculas encontradas en la hoja de coca y en los grupos de estudio

2.6.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Prueba χ^2 cuadrado en tablas de contingencia

La prueba de χ^2 cuadrado es una prueba no paramétrica que se utiliza para probar si las frecuencias observadas difieren en forma significativa de las esperadas bajo la hipótesis nula (Taucher, 1997).

Para realizar esta prueba, primero se plantea la pregunta de investigación que es la siguiente:

Existen diferencias significativas entre las moléculas presentes en los consumidores de hoja de coca con respecto a las encontradas en los consumidores de cocaína procesada?

A continuación, se proponen las hipótesis para esta pregunta de investigación:

Hipótesis nula (H_0): No hay diferencias entre las moléculas presentes en los consumidores de hoja de coca y las que se encuentran en consumidores de cocaína procesada.

Hipótesis alternativa (H_1): Hay diferencias entre las moléculas presentes en los consumidores de hoja de coca y las que se encuentran en consumidores de cocaína procesada.

✓ χ^2 calculado

Para calcular el χ^2 cuadrado se emplea la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{fxc} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

En donde,

O_i = Frecuencia observada en la celda i

E_i = Frecuencia esperada en la celda i

fxc = número de celdas, se obtiene multiplicando número de filas (f) por número de columnas (c) (Taucher, 1997).

La E_i se calculó como se muestra a continuación:

$$E_i = (Total\ fila \times total\ columna) / TOTAL$$

Datos obtenidos en el análisis de cada una de las moléculas

Tabla 6. Datos correspondientes a la presencia y ausencia de 10,18-bisnorabieta-8,11,13-triene en el grupo P y C

| MOLÉCULA | VARIABLES | P | C | TOTAL |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 10,18-bisnorabieta-8,11,13-triene | Presencia | 8 | 0 | 8 |
| | Ausencia | 2 | 11 | 13 |
| TOTAL | | 10 | 11 | 21 |

Tabla 7. Resultados del calculo del χ^2

| Frecuencias | | Diferencia | χ^2 cal |
|-------------------------------|------------------------------|-------------|-----------------------------|
| Frecuencia observada O_i | Frecuencia esperada E_i | $O_i - E_i$ | $\frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$ |
| 8 | 3,81 | 4,19 | 4,61 |
| 2 | 6,19 | -4,19 | 2,84 |
| 0 | 4,19 | -4,19 | 4,19 |
| 11 | 6,81 | 4,19 | 2,58 |
| TOTAL | | | 14,22 |

Tabla 8. Datos correspondientes a la presencia y ausencia del ácido octadecanoico en el grupo P y C

| MOLÉCULA | VARIABLES | P | C | TOTAL |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Ácido octadecanoico | Presencia | 7 | 1 | 8 |
| | Ausencia | 3 | 10 | 13 |
| TOTAL | | 10 | 11 | 21 |

Tabla 9. Resultados del calculo del χ^2

| Frecuencias | | Diferencia | χ^2 cal |
|-------------------------------|------------------------------|-------------|-----------------------------|
| Frecuencia observada O_i | Frecuencia esperada E_i | $O_i - E_i$ | $\frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$ |
| 7 | 3,81 | 3,19 | 2,67 |

| | | | |
|--------------|------|-------|-------------|
| 3 | 6,19 | -3,19 | 1,64 |
| 1 | 4,19 | -3,19 | 2,43 |
| 10 | 6,81 | 3,19 | 1,49 |
| TOTAL | | | 8,24 |

Tabla 10. Datos correspondientes a la presencia y ausencia de 1H-Azepine, hexahydro-1-(1-oxo-9-octadecenyl)- en el grupo P y C

| MOLÉCULA | VARIABLES | P | C | TOTAL |
|------------------------------------------------|------------------|-----------|-----------|--------------|
| 1H-Azepine, hexahydro-1-(1-oxo-9-octadecenyl)- | Presencia | 5 | 0 | 5 |
| | Ausencia | 5 | 11 | 16 |
| TOTAL | | 10 | 10 | 11 |

Tabla 11. Resultados del calculo del χ^2

| Frecuencias | | Diferencia | χ^2 cal |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| Frecuencia observada O_i | Frecuencia esperada E_i | $O_i - E_i$ | $\frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$ |
| 5 | 2,38 | 2,62 | 2,88 |
| 5 | 7,62 | -2,62 | 0,90 |
| 0 | 2,62 | -2,62 | 2,62 |
| 11 | 8,38 | 2,62 | 0,82 |
| TOTAL | | | 7,22 |

Tabla 12. Datos correspondientes a la presencia y ausencia del ácido tetradecanoico en el grupo P y C

| MOLÉCULA | VARIABLES | P | C | N | TOTAL |
|----------------------|------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| Ácido tetradecanoico | Presencia | 4 | 0 | 1 | 5 |
| | Ausencia | 6 | 11 | 9 | 26 |
| TOTAL | | 10 | 11 | 10 | 31 |

Tabla 13. Resultados del calculo del χ^2

| Frecuencias | | Diferencia | χ^2 cal |
|-------------------------------|------------------------------|-------------|-----------------------------|
| Frecuencia observada O_i | Frecuencia esperada E_i | $O_i - E_i$ | $\frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$ |
| 4 | 1,61 | 2,39 | 3,53 |
| 6 | 8,39 | -2,39 | 0,68 |
| 0 | 1,77 | -1,77 | 1,77 |
| 11 | 9,23 | 1,77 | 0,34 |
| 1 | 1,61 | -0,61 | 6,33 |
| 9 | 8,39 | 0,61 | 0,04 |
| TOTAL | | | 12,70 |

✓ χ^2 cuadrado crítico

Este valor se determinó de acuerdo a la tabla teórica del χ^2 , en donde se tuvo en cuenta los grados de libertad y el α de 0,05.

Los grados de libertad se determinan de la siguiente manera:

$gl = (f-1) \cdot (c-1)$, en donde f es el número de filas y c el número de columnas.

$$gl = (2-1) \cdot (2-1) = 1$$

El χ^2 crítico para $gl=1$ y $\alpha=0,05$, es igual a 3,8415.

La mayoría de las moléculas mencionadas anteriormente se analizaron con un gl de 1. Sin embargo, para el ácido tetradecaónico se empleó un $gl=2$, por lo tanto, su valor χ^2 crítico es igual a 5,9915.

Como se puede observar en todas las tablas de las moléculas, el χ^2 calculado $>$ χ^2 crítico, por lo tanto, se rechaza la H_0 indicando que si existen diferencias entre las moléculas presentes en los consumidores de hoja de coca y las que se encuentran en consumidores de cocaína procesada.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede afirmar que la presencia de una sola molécula candidata como biomarcador no es suficiente para hacer la diferenciación. Por tal motivo, para este tipo de estudios se recomienda analizar el conjunto de biomarcadores para confirmar la posible discriminación de los tipos de consumo.

2.7 DISCUSIÓN

En esta investigación se analizaron las muestras de orina de consumidores de té de coca, cocainómanos y muestras blanco, en donde se hizo un análisis de los posibles compuestos que puedan diferenciar entre un consumidor de hoja de coca y un consumidor de cocaína. Para ello, primero se realizó un análisis de las moléculas por cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas en hojas de coca provenientes de cultivos y las que se encuentran en las infusiones de té. Debido a que en la purificación de la cocaína se pierden muchos de los compuestos de la hoja de coca, se buscaba determinar moléculas que prevalecieran en las muestras de orina de consumidores de té de coca y que se encontraran ausentes en los consumidores de cocaína.

Extractos de hoja de coca y té.

De acuerdo a los espectros de fragmentación de masas obtenidos de ambos tipos de material vegetal, se logró determinar varios compuestos en donde se encuentra el alcaloide de la cocaína y sus metabolitos como ecgnodina metil éster, cinamilcocaína, entre otros, como se puede observar en las tablas 3 y 4 .

Según los resultados, en la infusión de té se identificaron varias moléculas adicionales pertenecientes a antioxidantes y ácidos grasos, entre otras, que no se encontraban en las hojas de cultivo. Esto puede ser debido a que las partes del arbusto de la hoja de coca se someten a otros procesos que incluyen molienda y secado y que por lo tanto, puede generar un cambio en la composición de la hoja original o la liberación de otras moléculas.

Para localizar las moléculas obtenidas en este té, se tuvo en cuenta el valor del ion molecular, el pico base y la abundancia relativa de cada uno de los picos.

Según la teoría, ecgonidina metil éster posee un pico base de 152 m/z que contiene la mayor abundancia relativa y un ion molecular de 181 m/z. En el resultado experimental se identificó esta molécula con una probabilidad del 96.1% y un tiempo de retención de 9.316 min en las hojas del té, y en las hojas de cultivo con una probabilidad del 88.1% y un tiempo de retención de 9.367 min. En cuanto a la cocaína, su pico base es de 82 m/z y su ion molecular es de 303 m/z y fue determinada en las hojas de té con una probabilidad de 91.2% y un tiempo de retención de 18.502 min. En las hojas de cultivo este alcaloide se detectó con un 94.2% de probabilidad y con un tiempo de retención de 18.502 min. Adicionalmente, se identificó la Cinamilcocaína en el té, que tiene un pico base de 82 m/z y un ion molecular de 329 m/z, con un 85.2% de probabilidad y un tiempo de retención de 21.765 min. En las hojas de cultivo se determinó con el 95.3% de probabilidad y un tiempo de retención de 21.841 min.

El método empleado en este estudio también puede separar los diferentes isómeros trans y cis de las moléculas. En las hojas de cultivo se determinó adicionalmente la trans-cinamilcocaina, que contiene un pico base de 82 m/z y un ion molecular de 298 m/z, y se detectó con una probabilidad del 72.6% y un tiempo de retención de 14.484 min. En cuanto a cis-cinamilcocaina, se detectó con un pico base de 82 m/z, un ion molecular de 329 m/z y con un tiempo de retención de 20.532 min y una probabilidad del 94.5%. También, se identificó la benzoilecgonina con una probabilidad de 79.2% y un tiempo de retención de 15.683 min. Su pico base es de 124 m/z y el ion molecular es de 289 m/z. Por último, la tropacocaina contiene un pico base de 124 m/z y un ion molecular de 245 m/z y se determinó con una probabilidad de 97.4% y un tiempo de retención de 15.843 min. Todos los picos base mencionados fueron detectados con la máxima abundancia relativa característica de las moléculas descritas en la teoría.

En cuanto a las moléculas de higrina y cuscohigrina no se detectaron con el método empleado, por lo tanto, se buscaron cuidadosamente en cada una de las señales del cromatograma de iones y patrones de fragmentación de masas y se compararon con los reportados en la literatura. Es importante mencionar que los estudios anteriormente realizados que identifican a estos dos alcaloides como biomarcadores, empleaban hojas de cultivo provenientes de Argentina. En esta investigación se pretendía comprobar si en las hojas de coca de Colombia, específicamente en la infusión de té se encontraban estas moléculas. Sin embargo, en ninguno de estos tipos de material vegetal se logró determinar cuscohigrina a pesar de realizar varias extracciones. Solo en las hojas de coca provenientes de cultivos se logró identificar un espectro similar a la molécula de la higrina, ya que sus señales concordaban con muchos de los picos característicos de su estructura teórica.

Sin embargo, en el extracto del té no se determinaron estas moléculas y esto se puede atribuir a que en el proceso de fabricación del té se requiere un proceso en donde las hojas son seleccionadas, trituradas, sufren molienda y secado y esto, puede cambiar la composición original de la hoja.

En los estudios anteriores en donde se comprueba que higrina y cuscohigrina son biomarcadores diferenciales se emplearon sujetos que masticaban las hojas de coca por horas. Por lo tanto, estas hojas no sufrían ningún tratamiento adicional en comparación con las hojas del té. Además, estos estudios se realizaron en zonas geográficas diferentes del continente sur americano con diferentes condiciones de cultivo, composición de suelo y factores ambientales. Adicionalmente, han existido cruces entre las especies lo que dificulta la correcta clasificación botánica de las plantas. En este mismo sentido, la cantidad de cocaína y de los alcaloides presentes en las hojas de coca también dependen de otros factores como: el tiempo en analizar la muestra después de su recolección, las condiciones de almacenamiento y la fracción y la edad de la hoja, ya que se ha demostrado que las hojas jóvenes de las ramas terminales en desarrollo reproductivo contiene un

mayor contenido de alcaloides, en comparación con las hojas maduras. (Johnson, 1995).

En esta investigación se emplearon dos tipos de hojas. Primero se usó hojas *Erythroxylum coca Lam* maduras provenientes de Argelia en el occidente del departamento del Cauca. Argelia es un municipio montañoso que se encuentra a una altitud de 1,250 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura media de 24°C (Sitio oficial de la Alcaldía de Argelia-Cauca, 2015).

Por otro lado, se encuentran las hojas del té “Biococa”, que es un producto comercializado por la comunidad indígena. Las hojas son trituradas y secadas y se disponen en bolsas para consumir en infusión. Cada bolsa tiene aproximadamente un gramo de hoja de coca y su presentación para el comercio es en cajas de 50 o 100 sobres. La fabricación de este producto se realiza actualmente en Bogotá, pero la materia prima proviene de Nueva Segovia de San Esteban de Caloto en el departamento del Cauca. Caloto se encuentra situado en el norte de este departamento con una altura de 1,100 metros sobre el nivel del mar, temperatura media de 25°C y humedad del 60% (Sitio oficial de la alcaldía de Nueva Segovia de San Esteban de Caloto, 2013).

De acuerdo a la literatura, ambos tipos de cultivos cumplen con la mayoría de las condiciones para el crecimiento óptimo de la planta. Además, estas hojas son muy comercializadas como materia prima y son distribuidas en todo el país por diferentes marcas comerciales.

Muestras de orina

Para estos análisis, primero se seleccionaron los compuestos presentes tanto en el té de coca como en las hojas de cultivo y se buscaron estos compuestos en las muestras de orina de todos los grupos del estudio.

En las muestras de los consumidores del té (Grupo P) aparecen algunos alcaloides, incluyendo la cocaína y sus metabolitos como ecgonina metil éster y ecgonidina metil éster. Seis de diez personas pertenecientes a este grupo tuvieron resultado positivo para cocaína y en las cuatro restantes, se encontraron los metabolitos que de igual manera confirman la presencia del alcaloide. Lo anterior sugiere que al realizar un análisis de estupefacientes a una persona que ha consumido aunque sea una bolsa de té de coca, tiene como resultado la presencia de cocaína o sus metabolitos como se menciona en algunos estudios previos. Por lo tanto, se evidencia la importancia de diferenciar entre los dos tipos de consumo, ya que los biomarcadores permitirían simplificar la toma de una decisión judicial o los procedimientos rutinarios que realizan los profesionales sanitarios.

En cuanto a la higrina y cuscohigrina, los alcaloides anteriormente mencionados que son reportados como biomarcadores en este tipo de muestras, no fue posible

detectarlos debido a que no se encontraban en los extractos del té utilizados en el estudio. Por consiguiente, en los extractos de orina de consumidores de esta infusión, no se encontrarían los citados compuestos. Un factor que influye sobre los resultados es que posiblemente en las especies cultivadas en Colombia no se encuentren estos alcaloides, ya que se analizaron dos tipos de hojas y no se identificaron estas estructuras a pesar de que se encontraban casi en la misma zona geográfica, específicamente en el departamento del Cauca con condiciones similares. Debido a esta situación, se buscaron otros componentes no alcaloides que pudieran servir como biomarcadores y se encontraron principalmente 4 compuestos que se encontraban presentes en las muestras de la mayoría de los consumidores de té de coca y ausentes en los consumidores de cocaína y muestras blanco.

Estas moléculas encontradas son: 10,18-bisnorabieta-8,11,13-triene, Octadecanoic acid, 1H-Azepine, hexahydro-1-(1-oxo-9-octadecenyl)- y ácido tetradecanoico. También, se encontraron otros compuestos pero en menor medida y se encuentran en la tabla 5.

El compuesto mas frecuente en estos consumidores es 10,18-bisnorabieta-8,11,13-triene (C₁₈H₂₆) que contiene un peso molecular de 242,399 g/mol (PubChem Compound). No se conoce exactamente su función pero se ha mencionado en estudios de compuestos volátiles para identificar moléculas que generan la fragancia en algunas flores como *citrus grandis* (Zakaria, Zakaria, & Ishak, 2010).

En cuanto al ácido octadecanoico (C₁₈H₃₆O₂) o comúnmente llamado ácido esteárico, es un ácido graso alifático saturado de cadena larga que se encuentra normalmente en algunos aceites vegetales y animales. Se caracteriza por ser empleado ampliamente en el campo industrial y su peso molecular es de 284,48 g/mol (Drugbank, 2007), (William Eduardo Herrera Agudelo, 2006).

Otra molécula determinada fue el ácido tetradecanoico (C₁₄H₂₈O₂) o ácido mirístico, que es un ácido graso alifático saturado que se encuentra en algunos aceites vegetales como el aceite de palma y la nuez moscada. Posee un peso molecular de 228,3709 g/mol (Drugbank, 2007), (William Eduardo Herrera Agudelo, 2006).

Y por último se encuentra el 1H-Azepine, hexahydro-1-(1-oxo-9-octadecenyl)- (C₂₄H₄₅NO) el cual tiene un peso molecular de 363,6202 g/mol (PubChem Compound) y hasta el momento no se conoce exactamente su función en las hojas de las plantas.

En cuanto a los cocainómanos, también se detectó cocaína, ecgonindina metil éster, ecgonina metil éster, cinamilcocaina, benzoilecgonina, tropacocaina, cinamilcocaina, trans y cis cinmailcocaina. Estos alcaloides se identificaron

principalmente en personas que de acuerdo a la historia clínica tienen una frecuencia de consumo alta del alcaloide y que por tanto, los metabolitos prevalecen en el organismo encontrándose en mayor cantidad en comparación con las personas que consumen ocasionalmente. Además, algunos de estos individuos no consumen la cocaína pura en forma de clorhidrato, si no que optan por presentaciones económicas como el bazuco o el crack que contienen un alto grado de impurezas.

En muchas de estas personas también se logró identificar la molécula de cocaetileno que es un producto del metabolismo de etanol y cocaína. Esto generalmente se observó en las personas que consumen eventualmente, ya sea un fin de semana o una fiesta. Estos aspectos están relacionados directamente con la farmacocinética del alcaloide, pues como se había mencionado anteriormente la determinación de ellos depende de la cantidad ingerida, del metabolismo de cada persona y de la eliminación e ingesta de los líquidos (Franklin Alcaraz del Castillo, 2005).

Un aspecto importante que se determinó en la investigación con respecto a este grupo de consumidores (Grupo C), es que se detectó el compuesto 2-ácido propénico, 3-fenil-, metil éster presente en estas muestras, que se encontraba ausente en las muestras de los consumidores de té de coca. Por lo tanto, esta molécula ofrece la posibilidad de servir como biomarcador para corroborar el consumo de cocaína como droga de abuso.

El 2-ácido propénico, 3-fenil-, metil éster ($C_{10}H_{10}O_2$) o metil cinamato, tiene un peso molecular de 162, 1852 g/mol y es un ácido orgánico que se encuentra en los aceites vegetales de varias plantas como en algunas variedades de albahaca (*Ocimum spp*) (Viña & Murillo, 2003). Esta molécula no se confirmó en todas las personas por lo que se requerirían estudios posteriores que permitan aprobar esta afirmación.

Por otro lado, en las muestras blanco (Grupo N) no se observó ningún alcaloide y tampoco se encontraron los compuestos candidatos para ser marcadores diferenciales, como era de esperarse. Estas muestras sirvieron en gran medida como control para probar la presencia de los componentes de interés en las muestras de orina.

Los resultados obtenidos de esta investigación aportarán información como base para realizar futuros estudios que permitan complementar el análisis de las moléculas y da herramientas para poder diferenciar eficazmente los tipos de consumo cuando se encuentra un resultado positivo para cocaína. Por lo tanto, se puede afirmar que no solo los alcaloides pueden ser biomarcadores diferenciales como se había mencionado en estudios anteriores, si no que también, pueden

existir otros compuestos como algunos ácidos grasos que puedan hacer tal diferenciación y faciliten la toma de decisiones judiciales.

En cuanto a los objetivos planteados en este estudio, estos se realizaron de acuerdo a los reportes científicos en donde se afirma que los alcaloides podían ser marcadores diferenciales, por lo tanto, se quería analizar estas moléculas en las hojas de coca colombianas. Sin embargo, se determinaron otros compuestos de tipo no alcaloides que pueden en conjunto servir como marcadores y que ayudarían a cumplir el propósito principal del estudio que es diferenciar entre los consumidores de cocaína y consumidores de hoja de coca. Además, fue posible realizar una caracterización de los compuestos químicos de *Erythroxylum coca* presentes en todos los grupos de estudio y se identificaron las moléculas de interés. También, se encontró que la higrina y cuscohigrina no se encuentran en las hojas de coca analizadas.

Como se había mencionado anteriormente la hoja de coca se utiliza por sus propiedades medicinales hace siglos de antigüedad por muchas personas. El estudio de estas características ha sido un aspecto de poca importancia en Colombia, pues las investigaciones se han centrado en el alcaloide de la cocaína, a pesar de que la hoja contenga otros componentes importantes. Por lo tanto, el estudio de la hoja de coca merece toda la atención e investigación pertinente para determinar no solo la composición de las hojas, si no también, sus propiedades farmacológicas, pues podría ser una solución natural a varios problemas de salud actuales. Con respecto a estas propiedades, se ha demostrado la influencia de la coca sobre la función cardiovascular y respiratoria en voluntarios, en donde se confirma un beneficio en el rendimiento de varias actividades en las grandes altitudes (Biondich & Joslin, 2015). Además, la hoja se ha caracterizado por su actividad anestésica, digestiva, diurética, entre otras, que en nuestro país sería de gran utilidad como medicina alternativa. Por ello, la información planteada en esta investigación permitirá proporcionar conocimientos que les permita a los organismos judiciales determinar cuándo existe realmente un agravante punitivo, favoreciendo a aquellas personas que utilicen la hoja de coca como tradición, cultura o con fines medicinales.

En cuanto al método utilizado en el estudio, se puede afirmar que es apto debido a que se logró encontrar en las muestras de orina muchos de los alcaloides presentes en las plantas, los cuales fueron comparados con los datos teóricos para confirmar las moléculas. Además, se identificaron otros compuestos no alcaloides diferenciales del tipo de consumo. Sin embargo, para corroborar estos procedimientos se requieren estudios posteriores que permitan complementar los resultados obtenidos.

Limitaciones

Una de las limitaciones presentadas en el estudio fue la disponibilidad de las muestras de orina principalmente de los voluntarios captados para el grupo de consumidores de cocaína, debido a que manifestaban incomodidad en dar su muestra por temor de ser juzgados socialmente a pesar de que se les explicó claramente los aspectos éticos incluyendo la confidencialidad.

En cuanto a la recolección de las muestras de orina de los voluntarios captados para el grupo de consumidores del té de coca, también se generaron dificultades en recolectar las muestras de orina pues a algunos de los participantes les resultó molesto contactarlos nuevamente. Además, se requería que la persona tuviera disponibilidad de tiempo para la recolección de la muestra en las 3 horas posteriores del consumo, máximo 4. No obstante, se consiguió el número de muestras planteadas, pertenecientes a los grupos de estudio, desde el principio de la investigación gracias a la colaboración de las fundaciones de rehabilitación y círculo social de los investigadores principales.

2.8 CONCLUSIONES

Se logró identificar posibles biomarcadores presentes en muestras de orina de consumidores de té de coca que se encontraban ausentes en los consumidores de cocaína. Entre los principales se encuentran: 10,18-bisnorabieta-8,11,13-triene, ácido octadecanoico, ácido tetradecanoico y 1H-Azepine, hexahydro-1-(1-oxo-9-octadecenyl)-. Estos compuestos en conjunto pueden ser útiles para diferenciar entre los dos tipos de consumos.

Se caracterizaron los componentes que normalmente se encuentran presentes en las hojas de coca provenientes de cultivos y las del té, en donde se encontraron varios alcaloides incluyendo la cocaína y sus metabolitos. Además, se analizaron otros compuestos volátiles no alcaloides en los dos tipos de material vegetal.

Se realizó un listado de todas las moléculas presentes en todos los grupos de consumidores para determinar los biomarcadores candidatos.

Se detectó un espectro similar a la molécula de higrina en las hojas de coca provenientes de cultivos. Sin embargo, en los consumidores de infusión de coca no fue posible determinarla debido a que este alcaloide no se encontraba en el extracto del té de coca.

El análisis estadístico para datos cualitativos dio como resultado, que sí existen diferencias entre las moléculas candidatas a biomarcadores presentes en los extractos de orina de voluntarios consumidores de té de hoja de coca y las que se encuentran en consumidores de cocaína procesada o cocainómanos.

2.9 RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con la caracterización botánica de los compuestos de la especie de hoja de coca, debido a que es un factor clave para determinar los biomarcadores candidatos.

Es importante tener en cuenta que la cantidad de alcaloides depende de las condiciones ideales de crecimiento de la planta que se mencionaron en el documento y la farmacocinética en el organismo de los voluntarios.

En lo posible, realizar el mismo procedimiento con personas que mastiquen o masquen las hojas de coca debido a que este estudio se realizó con las personas que consumieron la infusión. Además, en algunos de los estudios realizados emplean este tipo de voluntarios y los biomarcadores reportados en la literatura se obtuvieron con este procedimiento.

Se recomienda recoger las muestras de orina después del último consumo en varios intervalos de tiempo (horas y días) para determinar el momento de mayor concentración de las moléculas de estudio, ya que algunas pueden ser eliminadas con mayor rapidez dependiendo del tamaño del compuesto y de los grupos funcionales.

2.10 BIBLIOGRAFÍA

- Bruneton, J. (1993). *Farmacognosia, Fitoquímica; Plantas Medicinales*. Zaragoza: Acribia S.A.
- C. Rubio S. Strano-Rossi, M. T. (2012). Hygrine and Cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing. *Elsevier* .
- Cedro. (2004). Psicoactiva: Revista científica del Centro de Información y Educación para la Prevención del Abuso de Drogas. *Psicoactiva* .
- Douglas A. SKOOG, D. M. (1997). *Fundamento de química analítica*. Barcelona: Reverte.
- Bruneton, J. (1993). *Farmacognosia, Fitoquímica; Plantas Medicinales*. Zaragoza: Acribia S.A.
- Córdoba, D. (2006). *Toxicología*. Bogotá: Manual Moderno.
- Evans, W. (2009). *Trease and Evans' Pharmacognos*. Saunders, Elsevier.
- Harris, D. (2006). *Análisis químico cuantitativo*. Reverte.
- Sneader, W. (2005). *Drug Discovery: A History*. Inglaterra: John Wiley & Sons.
- Calabuig, G. (2004). *Medicina legal y toxicología* (6ª Edición ed.). Elsevier Masson.
- Lipp, F. (2002). *Herborismo*. España: Evergreen.
- Ripoll, D. R. (2011). *Cerebro y adicción*. UOC.
- Brunton, L., Lazo, J., & Parker, K. (2006). *Goodman and Gilman's; The pharmacological basis of therapeutics* (11 Edición ed.). Mc Graw Hill.
- Sifre, R. B. (2004). *Toxicología clínica*. (U. d. València, Ed.)
- UNODC. (2014). Colombia, Monitoreo de cultivos de coca 2013.
- Coca Nassa; Nasa Esh's*. (2011). Retrieved 10 de 05 de 2015 from <http://www.cocanasa.wix/>
- Zapata, N. L. (2006). Lo ambiental y lo social de la aspersion en Colombia ¿Política ambiental o estrategia antinarcoóticos?

Rubio, N. C., Hastedt, M., Gonzalez, J., & Pragst, F. (2014). Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios.

Miller, J., & Miller, J. (1993). *Estadística para química analítica*. Addison-Wesley Iberoamericana.

Casale, J., Mallette, J., & Jones, L. (2014). Chemosystematic identification of fifteen new cocaine-bearing *Erythroxylum* cultigens grown in Colombia for illicit cocaine production .

Nakahara, Y. (1999). Hair analysis for abused and therapeutic drugs .

Rivera, M., Aufderheide, A., Cartmell, L., Torres, C., & Langsjoen, O. (2005). Antiquity of coca-leaf chewing in the south central Andes: A 3,000 year archaeological record of coca-leaf chewing from northern Chile.

Pereira, L. (2010). Becoming coca: A materiality approach to a commodity chain analysis of hoja de coca in Colombia .

Torres, F. M., González, M. B., García, H., Weyers, I., Ugnia, L., Larripa, I. B., et al. (2006). La genotoxicidad del herbicida Glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados.

Johnson, E., & Foy, C. (1996). Biomass Accumulation and Alkaloid Content in Leaves of *Erythroxylum coca* and *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense* Grown in Soil with Varying pH .

Novak, Salemink, & Khan. (1984). Biological activity of the alkaloids of *Erythroxylum coca* and *Erythroxylum Novogranatense*.

Barrera, A. M., & Duque, M. J. (2 de Abril de 2011). Determinación de drogas de abuso en pelo. *Revista Española de Medicina Legal* .

UNODC. (2012). *Métodos recomendados para la identificación y el análisis de cocaína en materiales incautados* .

Cordero Vilca, T. A. (2002). Evaluación nutricional de la proteína de la hoja de coca.

William, A. C. (2005). LA COCA: “ASPECTOS TAXONÓMICOS Y COROLÓGICOS EN COLOMBIA” .

Drugbank. (2007). Retrieved 5 de 12 de 2015 from <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01515>

Bello, A. (2000). *Derivatives of benzoylecgonine, ecgonine and ecgonidine and methods for preparing and using same.*

Suzan Mazor, M. M. (22 de 03 de 2006). Coca tea consumption causes positive urine cocaine assay .

ANMAT. (17 de 02 de 2012). Cocaína. *Vademecum* .

Franklin Alcaraz del Castillo, J. Z. (2005). ¿Es posible diferenciar analíticamente un consumidor de coca de uno de cocaína?

Código penal Colombiano. (2000). From http://perso.unifr.ch/derechopenal/assets/files/legislacion/l_20130808_01.pdf

Jana Olivier, E. S. (2012). Comparison of the mineral composition of leaves and infusions of traditional and herbal teas .

Epocrates. (2015). From <https://online.epocrates.com/drugs/427310/cocaine-oronasolaryngeal/Monograph>

Johnson, E. (1995). *Alkaloid content in Erythroxylum coca tissue during reproductive development* .

Accuweather. (2015). From <http://www.accuweather.com/es/co/santander-de-quilichao/107886/current-weather/107886>

Zakaria, Z., Zakaria, S., & Ishak, M. A. (2010). Analysis of Major Fragrant Compounds from Citrus grandis Flowers Extracts .

PubChem Compound, N. C. (n.d.). From <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/614842#section=Top>

William Eduardo Herrera Agudelo, U. M. (2006). Obtención y caracterización del ácido esteárico a partir de aceite de palma a escala de laboratorio.

Sitio oficial de la Alcaldía de Argelia-Cauca. (16 de 10 de 2015). From http://argelia-cauca.gov.co/informacion_general.shtml

Sitio oficial de la alcaldía de Nueva Segovia de San Esteban de Caloto. (19 de 06 de 2013). From http://caloto-cauca.gov.co/informacion_general.shtml

Viña, A., & Murillo, E. (10 de 2003). Essential oil composition from twelve varieties of basil (*Ocimum spp*) grown in Colombia. *Journal of the Brazilian Chemical Society* .

Biondich, A. S., & Joslin, J. (2015). Coca: High Altitude Remedy of the Ancient Incas .

Fernández, P. L. (2009). Drogodependencias. (M. Panamericana, Ed.)

Taucher, E. (1997). *Bioestadística*. (E. Universitaria, Ed.)

2.11 ANEXOS

Anexo 1.

Tabla 14. Total de moléculas obtenidas en los extractos de hoja de coca

| MOLECULAS OBTENIDAS EN EL TE DE COCA |
|--------------------------------------------------------------------------------|
| Ecgonidine, methyl ester |
| Ácido acético 5-(2,2-dimethyl-6-oxocyclohexylidene)-3-methyl-pent-3-enyl ester |
| 5-(7a-isopropenyl-4,5-dimethyl-octahydroinden-4-yl)-3-methyl |
| Cocaine |
| Benzaldehyde diethylacetal |
| 2-propenoic acid, 3-phenyl- |
| Ecgonine methyl ester |
| Butylated hydroxytoluene |
| 2(4H)-benzofuranone, 5,6,7,7a- tetrahydro-4,4,7a-trimethyl,-(|
| Benzothiazole, 2-(methylthio)- |
| 2 (3H)-Benzothiazole |
| 5H-benzo(b)pyran-8-ol,2,3,5,5,8a-pentamethyl-6,7,8,8a-tetra |
| Tetradecanoic acid |
| Hexadecanoic acid, methyl ester |
| N,N-dicyclohexyl-phthalamide |
| n.hexadecanoic acid |
| 10,18-bisnorabieta-8,11,13-triene |
| Octadecanoic acid |
| Phenol,2,2-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- |
| 8,14-seco-3,19-epoxyandrostane-8,14-dione,17-acetoxy-3 |
| 1-phenanthrenecarboxylic acid, 1,2,3,4,4a,9,10,10a,-octah |
| Ehtyliso-allochololate |
| Benzothiazole,2-propyldithio- |
| Cinnamoylcocaine |
| 2-tert-butyl-6-(3-tert-butyl-2-methoxy-5-methylbenzyl)-4-methyl |
| 1H-Azepine, hexahydro-1-(1-oxo-9-octadecenyl)- |
| Dibenz[a,c]cyclohexane,2,4,7-trimethoxy |
| 2,4,6,8,10-tetradecapentaenoic,9a-(acetyloxy)-1a,1b |
| Cholest-5-en-3-one |
| Pyrrolidine,[(3beta)-3-(acetyloxy)-20-methyl-21-oxopregn-5-en |
| 7,8-epoxylanostan-11-ol,3-acetoxy- |
| Cyclohexane, isocyanato |
| Benzoic acid |
| 3-acetyl-N-methyl-tomatidine |
| p-Hydroxycinnamic acid, ethyl ester |
| 6-beta-Hydroxyfluoxymesterone |
| 2-quinoxalinecarboxamide, 3-amino-6,7-difluoro-.1,4-dioxi |

| MOLECULAS OBTENIDAS EN LA HOJA DE COCA PROVENIENTE DE CULTIVOS. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1-benzoyl-2-(pyrrolidinomethyl)piperidine |
| Heptanediamide, N,N-di-benzoyloxy- |
| Henzoic acid |
| 2-propenoic acid, 3-phenyl-,methyl ester |
| Ecgonidine, methyl ester |
| 2-propenoic acid, 3-phenyl |
| 7-methoxy-2,2,4,8-tetramethyltricyclo[5.3.1.0(4,11)undeca |
| Ecgonine methyl ester |
| Butylated hydroxytoluene |
| 2 (4H)-benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-,(|
| Benzene, 1,2,4,5-tetrakis(1-methylethyl)- |
| 3-hydroxy-7,8-dihydro-beta-ionol |
| Benzoic acid, 3,5-bis (1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-methyl |
| Trans-cinnamoylcocaine |
| Dibutylphthalate |
| Benzoylecgonine |
| Tropacocaine |
| Cinnamoylcocaine |
| Benzamide,2-hydroxy-N-(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinyl-) |
| Cocaine |
| Phenylacetoxycocaine methyl ester |
| Androst-5,7-dien-3-ol-17-one |
| Oxirane,2,2-[(1-methylethylidene)bis(4,1-phenyleneoxymethyl |
| 9-(2,2-dimethylpropanoilhydrazono)-3,6-dichloro-2,7-bis-[2- |
| 4,4-ethylenebis(2,6-di-tert-butylphenol) |
| 7,8-epoxylanostan-11-ol,3-acetoxy- |
| 8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-ene-2-carboxylic acid, 8-methyl-, methyl ester, (1r,5s)- |
| 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one |
| Allopseudomethylecgonine |
| 1 α H,5 α H-tropane-2 β -carboxylic acid, 3 β -hydroxy-, methyl ester |
| 2(4h)-benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-6-hydroxy-4,4,7a-trimethyl-, (6s-cis)- |
| Methyl 3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[|
| Methyl 8-methyl-3-(pentanoyloxy)-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylate # |
| 8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl benzoate |
| 8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl tropate |
| 8-Azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol, 6-methoxy-8-methyl- |
| Phenylacetoxyl ecgonine methyl ester |
| Cis-Cinnamoylcocaine |
| Trans-Cinnamoylcocaine |

Anexo 2. Formato de consentimiento informado.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

TITULO DEL ESTUDIO: "IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES QUE DESCARTEN LA PRESENCIA DE COCAÍNA COMO DROGA DE ABUSO"

PROTOCOLO: I-INML1

INVESTIGADOR PRINCIPAL: DIANA GAONA ACEVEDO QF (Estudiante) - FRANKLY JAVIER URBANO CERON QCO.
Ms Ciencias biomédicas.

INSTITUCIÓN: INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL SEDE CALI, UNIVERSIDAD ICESI.

PATROCINADOR: UNIVERSIDAD ICESI

TELEFONO CONTACTO: 5552334 ext 8342

COMITÉ DE ETICA: Comité de Ética Humana de la Universidad Icesi

Se invita a participar en el estudio "*Identificación de biomarcadores que descarten la presencia de cocaína como droga de abuso*". Su participación en la investigación es estrictamente voluntaria, es decir, usted puede optar por cooperar o negarse de hacerlo. En este formulario de consentimiento se describe el propósito, procedimientos, beneficios y riesgos del estudio, así como la manera de cómo se usará su información y quienes podrán verla.

El personal del estudio le responderá todas las preguntas que usted tenga sobre este formulario o el estudio. Lea detenidamente este documento y si después de leer usted decide participar, se le pedirá que lo firme en compañía de un testigo. Además, se le entregará una copia firmada y fechada para que la conserve en su poder.

PROPÓSITO Y OBJETIVO DEL ESTUDIO

Se le está invitando a participar en un estudio que tiene como propósito diferenciar entre una persona que consume hoja de *Erythroxylum coca* y una persona que consume cocaína como droga de abuso, a través del análisis de muestras de orina humana.

Para esto, se identificarán biomarcadores que se encuentren presentes en los consumidores de hoja de *Erythroxylum coca* y ausentes en los consumidores de cocaína. El estudio se realizará bajo la dirección de Frankly Urbano (Químico- Ms) y Diana Gaona Acevedo (Estudiante de Química Farmacéutica).

El estudio contará con la participación de 30 individuos y tendrá una duración de 6 meses desde la recolección de la muestras hasta el análisis final de los resultados obtenidos.

Si usted decide participar, deberá saber que existen tres grupos de consumidores dentro del estudio:

GRUPO N: Individuo mayor de edad, sin comorbilidades, sin antecedentes de consumo de psicofármacos o de hierbas medicinales que incluyan la hoja de coca.

Grupo P: Individuos mayores de edad, sin comorbilidades, sin uso de medicamentos farmacológicos los cuales hacen uso de la hoja de coca de manera tradicional, terapéutica o que reciban infusión de té de coca

proporcionado por el equipo de investigación.

Grupo C: Individuos mayores de edad, sin comorbilidades, que consuman habitualmente cocaína

Además, este estudio se compone de:

- Un periodo de 2 meses de convocatoria y selección de los participantes.
- Una vez cumpla con los criterios de selección, usted deberá firmar este consentimiento, se le realizará una valoración médica y se recolectará su muestra de orina.
- Si usted pertenece al Grupo P y recibió infusión de té de coca por parte de nuestro equipo, se analizarán las posibles reacciones o eventos adversos y se le brindará un seguimiento médico hasta las 24 horas por vía telefónica.
- También este estudio se compone de un periodo de análisis de muestras, tabulación de datos y análisis de los resultados obtenidos.

En resumen su participación activa en nuestro estudio será del tiempo necesario para recibir la explicación del protocolo de estudio, realizar lectura y comprensión del formulario de consentimiento informado, la valoración médica, la ingesta de la infusión proporcionada (si es el caso), y la recolección de la muestra de orina espontánea.

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO:

Si usted decide participar, se hará una recolección de los datos demográficos, evaluación de selección inicial y se le realizarán preguntas sobre su historia clínica, sus antecedentes personales, el uso de medicamentos y sus hábitos. Además, se le realizará un examen físico externo que incluirá la toma de presión arterial, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria.

Usted se ubicará en alguno de los tres grupos estudio mencionados anteriormente y se le asignará un código de identificación que garantice la confidencialidad de la información privada. Este código esta compuesto por un literal seguido de un número de la siguiente manera:

Literal P: Perteneciente al grupo de consumidores de hoja de coca.

Literal C: Si es consumidor de cocaína procesada.

Literal N: Perteneciente al grupo de personas no consumidoras.

En todos los casos se adicionará el número consecutivo de acuerdo a la cantidad de personas que participen en el estudio. Ejemplo: P-10: Consumidor número 10 del grupo de consumidores de hoja de coca.

Si usted pertenece al Grupo P y va recibir la infusión de té de coca, el equipo de investigación le brindará un vaso con agua tibia que contiene 2 sobres del té "Biococa" para su consumo inmediato. En el caso de que no salgan los resultados esperados, el grupo investigador podrá contactarse nuevamente con estos voluntarios para una nueva ingestión del té con la respectiva recolección de la muestra.

Posteriormente, se le pedirá que deposite su muestra de orina en un frasco plástico proporcionado por el grupo investigador el cual tendrá su código de identificación y la fecha.

Una vez usted nos proporcione su muestra esta será almacenada en un congelador a -20°C, hasta el momento del análisis.

RIESGOS Y POSIBLES MOLESTIAS.

En este estudio no se llevan a cabo procedimientos invasivos que generen algún tipo de riesgo o de discomfort personal para los participantes.

En cuanto a los individuos pertenecientes al Grupo P que reciban infusión de té de coca, no se espera ningún tipo de reacción adversa ya que hasta el momento no se ha reportado esta información.

POSIBLES BENEFICIOS

Si desea participar en la investigación, tenga en cuenta que no se presentará ningún tipo de beneficio directo para usted. El beneficio estará encaminado a su participación en el procedimiento para demostrar que el consumo tradicional de *Erythroxylum coca* difiere en gran medida al consumo de cocaína.

Es importante aclarar que como participante tendrá información sobre los resultados que se obtengan durante toda la investigación si usted lo desea.

Desea recibir información de los resultados? SI _____ NO _____

Dirección: _____

Email: _____

GASTOS PARA USTED

Usted no tendrá que pagar nada para participar en el estudio. Todos los costos de los procedimientos, productos requeridos, procesos químicos, tabulación y análisis de resultados serán cubiertos por el patrocinador del estudio.

REMUNERACIÓN

Usted no recibirá ningún pago por participar en este estudio.

PARTICIPACIÓN Y RETIRO DE VOLUNTARIOS.

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Usted puede optar por no participar en él o salirse en cualquier etapa del proceso, sin ninguna coacción, sanciones, o pérdidas de algún tipo.

SELECCIÓN DE GRUPO

Por favor marque con una X el grupo al que usted pertenece:

GRUPO N: Individuo mayor de edad, sin comorbilidades, sin antecedentes de consumo de psicofármacos o de hierbas medicinales que incluyan la hoja de coca. _____

Grupo P: Individuo mayor de edad, sin comorbilidades, los cuales hacen uso de la hoja de coca de manera tradicional, terapéutica o que reciban infusión de té de coca proporcionado por el equipo de investigación. _____

Grupo C: Individuo mayor de edad, sin comorbilidades, que consuman habitualmente cocaína. _____

He sido invitado(a) a participar en la investigación titulada como "Identificación de biomarcadores que descarten la presencia de cocaína como droga de abuso". He leído todo el documento con una comprensión total del mismo y todas mis preguntas fueron respondidas de manera clara y oportuna. Entiendo y acepto que no me proporcionará riesgos ni beneficios directamente, pero si doy mi contribución a la sociedad y al propósito del estudio. Autorizo la revelación de mis datos recolectados con fines de investigación o normativa tal como se describe en este documento. Con respecto a mi información personal, esta será manejada con completa confidencialidad. Por lo tanto, decido participar voluntariamente en el estudio teniendo en cuenta que me puedo retirar en cualquier momento sin ninguna presión o coacción.

Tome el tiempo que desee antes de decidir participar en este estudio. Con gusto contestaremos cualquier pregunta que tenga acerca de la investigación. Si tiene más preguntas, quiere comunicar intereses particulares, quejas acerca de la investigación o si tiene algún problema relacionado con el estudio, usted puede contactar a los investigadores principales: Frankly Urbano Cerón por correo electrónico (frankly80@hotmail.com) y en la Universidad Icesi a Diana Gaona Acevedo (dianita_gaona@hotmail.com) al teléfono 5552334 ext 8342. En cualquier caso, si desea discutir sus derechos como participante, intereses, preguntas u obtener más información, puede contactar al presidente del comité de ética de la Universidad Icesi Yoseth Ariza Araújo al correo electrónico yjariza@icesi.edu.co o al teléfono (572) 5552334 extensión 8140.

PARTICIPANTE

TESTIGO

Firma

Firma

Fecha

Fecha

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Nombre

Firma

Fecha

Anexo 3. Formato de valoración médica de selección.

VALORACION MÉDICA COMPLETA DE SELECCIÓN

SUJETO No _____

FECHA _____

HORA _____

CONSENTIMIENTO INFORMADO:

El consentimiento informado se discutió con el paciente. El formato fue firmado y fechado por el paciente, el testigo y el Investigador. Al paciente se le dio tiempo adecuado para revisar el ICF y todas sus preguntas fueron resueltas.

SI NO

Fecha en que se firma el ICF por el sujeto o el representante legal : _____ / _____ / _____

Versión del ICF que se firma: _____

Se le entregó una copia firmada al paciente antes del cualquier procedimiento del estudio SI NO

DATOS DEMOGRÁFICOS Y CARACTERÍSTICAS ESPECIALES

Edad: _____ años Fecha Nacimiento: _____ / _____ / _____ Sexo: Hombre Mujer

Etnia: Hispanico o Latino; No-Hispanico No reportado Desconocida

Raza (Seleccione una o más): Blanco Negro / Afro- Asiático Indio Americano o Nativo de Alaska Otro _____

Dirección de residencia: _____

Teléfono de contacto: _____

VALORACION MÉDICA

PA _____ FC _____ FR _____ PESO _____ TALLA _____ FUM _____ Embarazo _____

ANTECEDENTES DE IMPORTANCIA (médicos, farmacológicos, alérgicos, hábitos de consumo ,etc)

PIEL Y MUCOSAS _____

OJOS: Congestión conjuntival SI _____ NO _____

PUPILAS _____

COORDINACIÓN MOTORA, EQUILIBRIO Y MARCHA

- Prueba de movimiento (dedo - nariz- dedo.dedo) Normal _____ Alterada _____ No se realiza _____
- Test de movimientos rápidos alternos : Normal _____ Alterada _____ No se realiza _____
- Prueba de marcha en Tamden (punta talón): Normal _____ Alterada _____ No se realiza _____

PRESENTACION, PORTE, APTITUD Y CONDUCTA MOTRIZ:

SENSORIO

Estado de Conciencia _____

Orientación _____

Atención _____

Memoria _____

LENGUAJE

Disartria: Negativo

discreta _____

Evidente _____

Otras Alteraciones _____

ALTERACIONES DEL PENSAMIENTO, PERCEPCION, JUICIO Y RACIOCINIO

CRITERIOS DE INCLUSION

- Mujeres y hombres mayores de edad SI___ NO___
- Sujeto que no presente ningún tipo de comorbilidad que requiera uso de medicamentos farmacológicos SI___ NO___
- Disponibilidad de tiempo requerido para la recolección de orina SI___ NO___

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Mujeres embarazadas SI___ NO___
- Uso de medicamentos farmacológicos SI___ NO___
- Sujeto que en valoración médica se encuentre en fase de intoxicación aguda por cocaína con alteración en la capacidad de tomar decisiones SI___ NO___
- Mas de 24 horas del último consumo en sujetos consumidores de hoja de coca. SI___ NO___

PARA PACIENTES DEL GRUPO P O C:

- Consumidor de planta de coca habitual SI___ NO___
Habito de consumo (marca, cantidad, horarios, tiempo de consumo) _____
- Consumidor de cocaína procesada: SI___ NO___
Habito de consumo (marca, cantidad, horarios, tiempo de consumo) _____
- Recibe té de coca proporcionado por el grupo de investigación SI___ NO___ Hora: _____

CALIFICACIÓN DEL SUJETO

- Sujeto es elegible: SI___ NO___

EVENTOS ADVERSOS:

Han ocurrido eventos adversos SI___ NO___

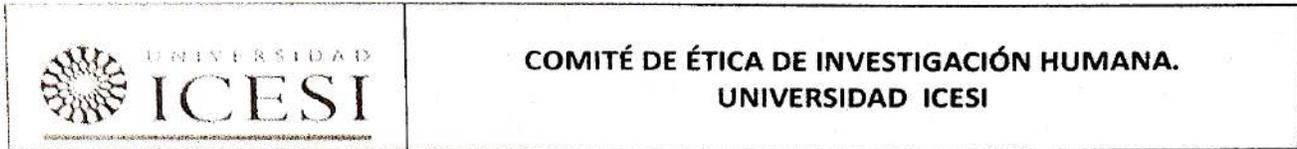
Cuales _____

COMENTARIOS:

_____/_____/_____
Firma del médico Fecha

_____/_____/_____
Firma del Investigador Fecha

Anexo 4. Aprobación del proyecto por el Comité de Ética Humana de la Universidad Icesi.



Acta de Aprobación N° 042

Proyecto:

Protocolo de evaluación para la identificación de biomarcadores que descarten la presencia de cocaína como droga de abuso.

Sometido por: Frankly Javier Urbano Ceron, Guillermo Montoya, Dana Gaona

El Comité de Ética de Investigación Humana de la Universidad Icesi, creado mediante la Resolución de Rectoría No. 763 del 13 de Abril del 2010, se rige por la Resolución 008430 del 04 de Octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Medica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, titulo 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000

Este Comité certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> | Resumen del Proyecto | <input checked="" type="checkbox"/> | Protocolo de Investigación |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Formato de consentimiento informado | <input type="checkbox"/> | Instrumento de recolección de datos |
| <input type="checkbox"/> | Folleto del investigador (si aplica) | <input type="checkbox"/> | Carta de instrucciones a participantes |
| <input type="checkbox"/> | Resultados de evaluación por otros comités (si aplica) | | |

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité:

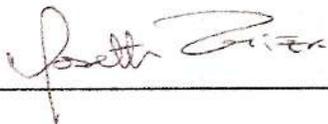
3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente Clasificación de Riesgo:

- | | | | | | |
|--------------------------|------------|-------------------------------------|---------------|--------------------------|-------------------------|
| <input type="checkbox"/> | Sin Riesgo | <input checked="" type="checkbox"/> | Riesgo Mínimo | <input type="checkbox"/> | Riesgo Mayor del Mínimo |
|--------------------------|------------|-------------------------------------|---------------|--------------------------|-------------------------|

4. Que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.

5. La forma de obtener el consentimiento informado de los participantes en el estudio es adecuada
6. Este proyecto será revisado nuevamente en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o se las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio
7. Informará inmediatamente a las directivas institucionales:
 - a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
8. Informará inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:
 - a. Lesiones a sujetos humanos.
Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas
 - b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por el Comité
9. El presente proyecto ha sido aprobado por un periodo de 1 año a partir de la fecha de aprobación.
Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados
10. El investigador principal deberá informar al Comité
 - a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrá iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
 - c. Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario (a) y al presidente.
 - d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes
 - e. Cualquier decisión tomada por otros comités de ética
 - f. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto
 - g. El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

Firma: _____



Fecha:

18

08

2015

Nombre: **Yoseth Ariza-Araujo**

Teléfono: **5552334 ext. 8140**

Capacidad representativa: **Presidente del Comité de Ética Humana**