Detección de Benzoilecgonina en orina de consumidores de té de coca mediante métodos de inmunoensayo

Detection of Benzoilecgonine in urine of consumers of coca tea by immunoassay methods

Yarima A Velásquez[1], Yajaira Del V Hernández[1], Lester Y Rodríguez[1], Alexis R Morales[1], Jacinto Rincón[1], Luis Ramírez[1].

RESUMEN

Con el fin de detectar la presencia de benzoilecgonina en orina de consumidores de té de coca, se realizó un estudio piloto analizando muestras de orina a 10 voluntarios sanos, no consumidores de cocaína, antes de ingerir la infusión de té de coca (Nasa Esh´s Coca Nasa), y las recolectadas hasta las 48 horas después de la ingestión, de una toma única de 100 mL el mismo día. El análisis se realizó por métodos de inmunoensayo, cualitativo, mediante pruebas rápidas Acu-check, y semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite, basado en Inmunoensayo de Fluorescencia Polarizada (FPIA). Antes de la ingestión de la infusión por los métodos cualitativos y semicuantitativos las muestras recolectadas resultaron negativas, después de haber ingerido la infusión, por ambos métodos se detectó concentraciones de benzoilecgonina desde la primera hasta las 48 horas con diversas variaciones entre las muestras, observándose excelente concordancia entre los métodos para la determinación de benzoilecgonina en orina. En este estudio, se concluyó que existe la presencia de benzoilecgonina en muestras de orina de consumidores de té de coca. Los métodos utilizados sólo proporcionan resultados preliminares, se recomienda utilizar unos más específicos a fin de encontrar parámetros que permitan discriminar individuos que hayan ingerido infusión de té de coca, de aquellos que son adictos a la cocaína. Además, es importante prevenir a los consumidores de té de coca sobre el riesgo de detección de benzoilecgonina en orina dentro de las primeras 24 a 48 horas y las implicaciones que trae consigo tales hallazgos de laboratorio.

Palabras clave: Infusión de Té de coca, cocaína, metabolitos de cocaína, benzoilecgonina, consumidores.

ABSTRACT

In order to detect the presence of benzoylecgonine in urine of consumers of coca tea, a pilot study was conducted by analyzing urine samples from 10 volunteers not cocaine users, before drinking the coca tea infusion, and collected until 48 hours after ingestión of a single shot (100 mL) the same day, The analysis was performed by immunoassay qualitative methods, using fast Acu-check tests, and semi quantitative automated equipment Abbott Axsym System, based on fluorescence polarization immunoassay (FPIA). Before ingestion of the infusion for qualitative and semiquantitative methods for samples collected were negative, and after drinking the tea, for both methods, concentrations of benzoylecgonine was detected from the first to 48 hours with several variations between samples, observed excellent agreement between the methods for the determination of benzoilecgonine in urine. In this study, we concluded that there is the presence of benzoylecgonine in urine samples from consumers of coca tea. According to the methods used provide only preliminary results, we recommend using a more specific in order to find parameters to discriminate individuals who have ingested coca tea infusions of dose that are cocaine addicts, In turn, it is important to prevent cosumers coca tea on the risk of detection of benzoylecgonine in urine within the first 24 to 48 hours and the implications it brings such laboratory findings.

Key words: tea infusion of coca, cocaine, metabolites of cocaine, benzoylecgonine, consumers.

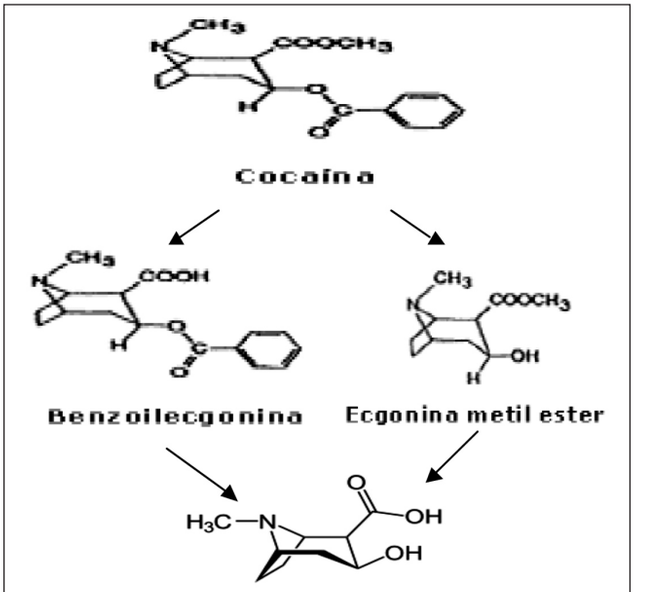
[1] Grupo de Investigaciones en Toxicología Analítica y Estudios Farmacológico (GITAEF). Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.
Autor principal: Teléfono: 0274-2403488 (Ofic.) 0424-7305542/0414-7457308
E-mail: yarimavel@hotmail.com, yajairahve@yahoo.com, lesteryomar@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La cocaína, es el principal alcaloide de las hojas de la planta de coca, *Erythroxylum coca,* arbusto que crece en un ambiente ecológico húmedo, entre los 500 y 2000 metros sobre el nivel del mar, perteneciente al género de la familia de las plantas tropicales Erythoxyláceas, originaria de la región andina de la América del Sur, cuyo uso se remonta al siglo XV, donde los indígenas masticaban mezclada con cal con la finalidad de disminuir la fatiga y sensación de hambre (1) (2) (3). La absorción de los alcaloides de las hojas de coca es muy variable, dependiendo principalmente del contenido de las hojas, de la preparación usada y de la presencia o ausencia de sustancias alcalinas en la boca del masticador así como la habilidad de éste (4).

El mate de coca, es la infusión comercial, tipo té, preparada con hojas de coca molidas en bolsitas filtrantes y que se pueden adquirir en establecimientos comerciales (5). La ingestión de la infusión de hoja de coca, constituye una costumbre en la región andina, siendo de uso habitual por la población campesina del Perú y Bolivia principalmente, y en algunos sectores poblacionales de Ecuador y Argentina, debido a los objetivos socio-antropológicos tradicionales y de salud (6) (7). El mate de coca es muy utilizado por sus bondades digestivas, circulatorias, respiratorias, antifatigante y antiestrés, puede llegar a provocar leves pero significativos efectos del estado de ánimo, considerándose que puede llegar a producir posiblemente efectos antidepresivos en el organismo (7). Para los fines anteriormente descritos es preferible utilizar las bolsitas filtrantes ya que son las únicas unidades industriales pesadas y homogeneizadas, contienen aproximadamente 1 gramo de hoja de coca naturales molidas (5). Se ha descrito que la concentración de cocaína en las hojas de coca va de 0,5% a 1,5% (4). La infusión tipo té, se prepara colocando una bolsita filtrante en una taza de 200 mL de agua caliente, aproximadamente durante 3 minutos, liberándose así cocaína contenida en las hojas secas (5).

Según la literatura existente del Instituto Boliviano de Biología de la Altura, 1997, es indiscutible el hecho de que tanto la hoja de coca seca, utilizada para la elaboración de mate en bolsitas, sola o acompañada de otra sustancia como por ejemplo anís o manzanilla, produce los mismos metabolitos que la cocaína ingerida en forma de clorhidrato o pasta base (1), es decir, benzoilecgonina (BE), ecgonina metil ester y posteriormente ecgonina (1) (8) (9). En el organismo como en muestras acuosas la benzoilecgonina no se produce enzimáticamente sino por hidrólisis simple. Las colinesterasas pueden convertir la benzoilecgonina a ecgonina enzimáticamente (4). Siendo la benzoilecgonina el principal metabolito de la cocaína que se detecta en la orina (6) (10) (11) (12).



Fuente: (9) (13) (14)

Figura 1. Estructura química de la cocaína y sus metabolitos.

La implementación de procedimientos para la detección de uso de drogas ilegales como la cocaína, en el ámbito laboral y en otros muy importantes como el deportivo, se ha venido incrementando en Venezuela y en muchos otros países del mundo, ello debido a que el consumo de cocaína en sus diferentes formas ha ido en aumento entre adolescentes, adultos jóvenes, deportistas, etc, y al constituir ésta una droga con un potente efecto adictivo (15), se convierte en un grave problema desde el punto de vista toxicológico, laboral, social, y de seguridad ciudadana, representando un severo problema para las sociedades contemporáneas (11), como consecuencia de ello, se ha generado la necesidad de análisis y detección de drogas en fluidos biológicos (11) (12) (15). La orina es una matriz biológica donde se puede detectar la

droga y obtenerse información de exposición a corto plazo (15). Así, el objetivo de este estudio piloto fue detectar la presencia de benzoilecgonina en orina de consumidores de té de coca (Nasa Esh´s Coca nasa) mediante métodos de inmunoensayo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población objeto de estudio

El universo de investigación estuvo conformado por personas adultas sanas entre hombres y mujeres, no consumidores de cocaína y cuyas edades oscilaron entre 22 y 43 años, respectivamente.

Muestra de pacientes participantes

Mediante un método de muestreo no probabilístico se logró reunir información de 10 personas voluntarias, previo consentimiento por escrito, y explicación por parte del equipo profesional del objetivo de dicha investigación. Los datos de los sujetos fueron recolectados a través de una encuesta con la finalidad de asegurar que cumplieran con los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión

En este estudio se estableció que las 10 personas voluntarias no fueran consumidores de cocaína, a las cuales se les indicó que durante el estudio debían abstenerse de ingerir otro tipo de infusión, bebidas alcohólicas y medicamentos.

Material biológico

Las muestras de orina fueron recolectadas por los pacientes bajo estrictos controles de recolección antes y después de la ingestión de la infusión de té de coca (Nasa Esh´s Coca nasa). Para la recolección de la orina, en el laboratorio se le proporcionó a cada voluntario envases secos, estériles y sin preservativos para el análisis inmediato de la misma.

Metodología

Para la determinación de benzoilecgonina en orina, se analizaron por triplicado las muestras de orina de los 10 voluntarios consumidores de infusión de té de coca (Nasa Esh´s Coca Nasa), antes de ingerir la infusión y las recolectadas en las siguientes 48 horas después de la misma. Para ello, se establecieron horas específicas de recolección con la finalidad de vigilar y supervisar el proceso dentro del laboratorio y así evitar errores durante la etapa pre-analítica, por lo cual, después de la ingestión de la infusión, se seleccionó para el análisis la orina recolectada en la 1era, 3era, 24, 36 y 48 horas.

La infusión de té de coca (Nasa Esh´s Coca Nasa) utilizada en esta investigación es elaborada en Colombia, por la Industria Indígena del Cauca, la cual contiene 20 bolsitas aromáticas de Coca, con un peso neto contenido en la caja de 20 g. Cada bolsita de infusión de té de coca (Nasa Esh´s Coca Nasa) se preparó en 100 mL de agua tibia, la cual fue ingerida por los voluntarios en una toma única el mismo día y a la misma hora.

Fuente: (16)

Figura 2. Presentación comercial de la infusión de té de coca (Nasa Esh´s Coca Nasa).

A las muestras de orina recolectadas por los pacientes antes de ingerir la infusión de té de coca (Nasa Esh´s Coca Nasa), se les realizó una prueba cualitativa, Acu-check, prueba rápida de un solo paso cocaína/benzoil/ecgonina para la detección de benzoilecgonina en la orina, de lectura directa, y no requiere instrumentación, la cual emplea un anticuerpo único monoclonal escogido para la selección e identificación de benzoilecgonina en la muestra de orina con un alto grado de sensibilidad, cuyo principio consiste en una cromatografía absorbente en la cual la droga y sus metabolitos (antígeno) en la muestra compiten con un conjugado de la droga (antígeno) inmovilizado en la membrana porosa en los sitios libres del anticuerpo. Durante la prueba, la orina migra por acción capilar, si el antígeno (benzoilecgonina) se encuentra por debajo de 300 ng/mL, no va a saturar los

sitios de unión del anticuerpo por completo, y los espacios libres en el anticuerpo van a ser ocupados por el antígeno inmóvil (benzoilecgonina) de la tira provocando una línea coloreada visible que aparece en la región tets. La región coloreada no se hará visible en la región test si los niveles de antígeno (benzoilecgonina) se encuentran por encima de 300 ng/mL ya que van a saturar todos los sitios de unión del anticuerpo (17).

Las muestras de orina recolectadas en la 1era, 3era, 24, 36 y 48 horas siguientes a la ingestión de la infusión de té de coca (Nasa Esh´s Coca Nasa) se analizaron mediante dos métodos de inmunoensayo: el cualitativo Acucheck, anteriormente descrito, y el AxSYM Cocaine Metabolite, ensayo semi-cuantitativo para la detección del principal metabolito urinario de la cocaína, benzoilecgonina, el cual utiliza la tecnología de Inmunoensayo de Fluorescencia Polarizada (FPIA) y presenta como nivel mínimo de detección (cut-off) 300 ng/mL (18). Las mediciones se realizaron en el equipo automatizado Axsym System de la casa comercial Abbott, analizador basado en (FPIA), el cual se fundamenta en la reacción antígeno anticuerpo, de unión competitiva, entre el antígeno marcado con fluoresceína (fármaco trazador) y el antígeno del paciente (fármaco a determinar), siendo los participantes en la reacción de enlace competitivo, el anticuerpo, el antígeno del paciente y el antígeno marcado con fluoresceína (trazador). Al formarse el enlace competitivo, la proporción antígeno del paciente/trazador condiciona la cantidad de complejo anticuerpo trazador que se forma y es responsable de la polarización resultante, en la medida que la muestra del paciente contenga mayor cantidad de antígeno (fármaco), este desplazará al trazador de su unión con el anticuerpo y conducirá a una menor concentración del complejo anticuerpo-trazador, lo que hará que la polarización resultante sea más baja, y si existe una baja concentración del antígeno en la muestra habrá una elevada concentración del complejo anticuerpo- trazador y la polarización será más alta. Esta técnica se caracteriza por la rapidez y sencillez en su manejo y por no requerir tratamiento previo de la muestra, o ser muy sencillo, y entre los inconveniente más destacables es el no determinar metabolitos y el elevado coste (19) (20).

Para determinar si los métodos utilizados para la detección de benzoilecgonina en orina arrojaban resultados falsos positivos, las muestras de orina de los 10 voluntarios, fueron analizadas antes de la ingestión de la infusión de té de coca (Nasa Esh´s Coca Nasa), por el método cualitativo Acu-check y semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite, con lo cual a su vez se obtuvo referencia de los niveles basales de cada uno de los sujetos voluntarios.

La calibración de los métodos utilizados para la detección de benzoilecgonina en orina de los voluntarios participantes en este estudio, fue realizada utilizando los calibradores comerciales rutinariamente empleados por el método semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite, los cuales incluyen los calibradores A,B,C,D,E y F, donde el calibrador A contiene orina humana y los calibradores B a F contienen preparado de benzoilecgonina en orina humana para producir las concentraciones de 0, 300, 1000, 2000, 3000 y 5000 ng/mL respectivamente (18).

Los métodos utilizados en esta investigación, cualitativo Acu-check y el semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite, solo aportan resultados analíticos preliminares los cuales deben ser confirmados por otros métodos más específicos, tal como la cromatografía de gases/ espectrofotometría de masas (17) (18).

El centro operativo del presente estudio, fue el Laboratorio de Toxicología Analítica dependiente de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, ubicado en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA). Mérida-Venezuela.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Mediante un análisis estadístico descriptivo, a través de un método de muestreo no probabilístico se logró reunir información de las 10 personas voluntarias involucradas en el estudio. Los datos obtenidos fueron procesados mediante el software estadístico R, versión 2.7.0, cuyo análisis consistió en:

1. Tablas de frecuencia de información relevante de los pacientes.
2. Estimación de la Función de Supervivencia de Kaplan y Meier, en base a la observación del evento, resultado positivo de benzoilecgonina (21).
3. Comparación de los métodos de inmunoensayo, método cualitativo Acu-check y semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite, mediante el coeficiente Kappa (22).

RESULTADOS

En este estudio los análisis se iniciaron con el procesamiento de las muestras de orina recolectadas por los 10 voluntarios antes de ingerir la infusión de té de coca (Nasa Esh´s Coca Nasa), se observa que mediante el método Acu-check los resultados fueron negativos y por el método semicuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite no se produjeron resultados positivos al no detectarse concentraciones de benzoilecgonina en las muestras procesadas, lo que demuestra que en el procesamiento analítico no se obtuvieron resultados falsos positivos (Tabla Nº 1).

Al realizar las determinaciones con el método cualitativo Acu-check utilizando los calibradores comerciales del método semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite, a diferentes concentraciones de benzoilecgonina, en los cuales estaban incluidos los valores cut-off establecidos para el método Acu-check, se observó que a concentraciones iguales o mayores de 300 ng/mL por el método semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite, resultaron positivos para el Acu-check (Tabla Nº 2).

En la Tabla Nº 3 se muestran los resultados del análisis realizado mediante el método cualitativo Acu-check a las muestras de orina de los 10 voluntarios, recolectadas en un lapso de 48 horas después de ingerir la infusión de té de coca (Nasa Esh´s Coca Nasa). En la misma se puede observar que se obtienen resultados positivos para benzoilecgonina en la orina analizada a la primera y a la 3 horas posteriores a la ingestión en los 10 voluntarios participantes en el estudio. Al realizar el análisis en la orina recolectada en las horas subsiguientes 24, 36 y 48,

Tabla Nº 1

Resultados obtenidos de las muestras de orina de los voluntarios antes de ingerir la infusión de té de coca (Nasa Esh's Coca Nasa) por los métodos empleados en el estudio

Métodos de Inmunoensayo	Muestras de orina procesadas por triplicado	Resultados obtenidos por los métodos empleados
Cualitativo Acu-check	10 (30 determinaciones)	10 (30 determinaciones) Negativos
Semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite (FPIA)	10 (30 determinaciones)	0 Positivos

Fuente: Laboratorio de Toxicología Analítica dependiente de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, ubicado en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA). Mérida-Venezuela.

Tabla Nº 2

Resultados obtenidos con el método cualitativo Acu-check utilizando los calibradores comerciales del método semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite (FPIA)

AxSYM Cocaine Metabolite (FPIA)	Concentración (ng/mL)	Resultado Acu-check
A	0	Negativo
B	300	Positivo
C	1000	Positivo
D	2000	Positivo
E	3000	Positivo
F	5000	Positivo

Fuente: Laboratorio de Toxicología Analítica dependiente de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, ubicado en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA). Mérida-Venezuela.

se obtienen resultados positivos con diversas variaciones de persistencia entre las muestras hasta las 48 horas posteriores a la ingestión de dicho té, así se tiene que a las 24 horas todas las muestras fueron positivas a excepción de las muestras de los voluntarios 7 y 8, a las 36 horas el análisis arrojó resultados positivos para las muestras de los voluntarios 2, 3 y 4, observando resultados positivos hasta las 48 horas en las muestras 2 y 3.

A partir de los datos de la Tabla Nº 3, se obtiene la función de supervivencia estimada de Kaplan y Meier (21). En total se tienen 50 determinaciones y el evento de interés fue, resultado positivo de benzoilecgonina (P).

En la Tabla Nº 4 se observa que el evento, resultado positivo de benzoilecgonina (P), ocurrió en 33 de las veces que se repitió la prueba, en diferentes instantes de tiempo, la mediana de supervivencia fue de 24 horas, lo que significa que, en el 50% de las repeticiones de la prueba ocurrió el evento máximo a las 24 horas después de haber ingerido el té de coca.

La Tabla Nº 5, muestra la función de supervivencia estimada de Kaplan y Meier para el evento diagnóstico positivo de benzoilecgonina, donde se observa que, una hora después de haber ingerido té de coca, la probabilidad de que el resultado de benzoilecgonina sea positivo, al menos en ese instante de tiempo, es de 0.80; notándose que el evento ocurrió en los 10 pacientes del estudio. El segundo tiempo de observación fue 3 horas después de haber ingerido el té de coca, la probabilidad de que el evento sea observado, al menos en ese instante de tiempo, es de 0.60; el mismo ocurrió nuevamente en los 10 pacientes del estudio. El tercer tiempo de observación fue 24 horas después de haber ingerido té de coca, la probabilidad de observación del evento al

Tabla Nº 3

Resultados del análisis por el método cualitativo Acu-check a las muestras de orina de los voluntarios después de ingerir la infusión de té de coca (Nasa Esh's Coca Nasa)

	Personas voluntarias									
Tiempo (horas)	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
24	P	P	P	P	P	P	N	N	P	P
36	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N
48	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N

Fuente: Laboratorio de Toxicología Analítica dependiente de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, ubicado en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA). Mérida-Venezuela.

P= Resultado de la prueba Positivo; N=Resultado de la prueba Negativo.

Tabla Nº 4

Estadísticas básicas de la función de supervivencia para el evento resultado positivo benzoilecgonina

n	Eventos	Mediana	Media	Li (0.95)	Ls (0.95)
50	33	24	22.4	3	48

Donde:

n: Número total de determinaciones o repeticiones de la prueba.
Eventos: Número de veces que ocurrió el evento de interés.
Mediana: Mediana de supervivencia.
Media: Media aritmética de supervivencia.
Li (0.95): Límite de confianza inferior del 95% para la mediana de supervivencia.
Ls (0.95): Límite de confianza superior del 95% para la mediana de supervivencia.

Tabla Nº 5

Función de Supervivencia estimada de Kaplan y Meier para el evento diagnóstico positivo de benzoilecgonina

Tiempo	Riesgo	Eventos	Supervivencia	Err. Est	Li (0.95)	Ls (0.95)
1	50	10	0.800	0.0566	0.696	0.919
3	40	10	0.600	0.0693	0.478	0.752
24	30	8	0.440	0.0702	0.322	0.602
36	20	3	0.374	0.0692	0.260	0.538
48	10	2	0.299	0.0728	0.186	0.482

Donde:
Tiempo: Tiempos de supervivencia medidos en horas.
Riesgo: Número de veces que pudiera ocurrir el evento en cada instante de tiempo.
Eventos: Número de veces que ocurrió el evento de interés.
Supervivencia: Probabilidad de que el evento ocurra al menos en ese instante de tiempo.
Err. Est: Error estándar de la supervivencia.
Li (0.95): Límite de confianza inferior del 95% para la supervivencia.
Ls (0.95): Límite de confianza superior del 95% para la supervivencia.

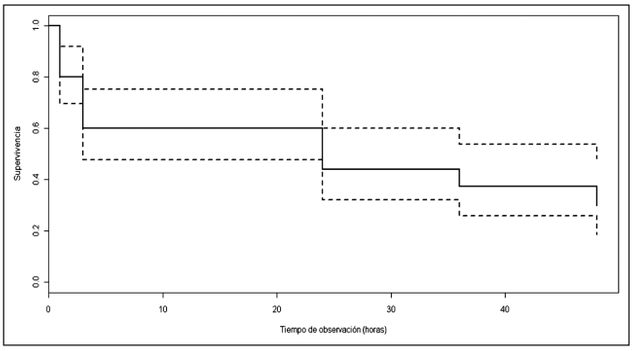
menos 24 horas después de haber ingerido té de coca es de 0,44; en este instante de tiempo el evento ocurrió en 8 pacientes del estudio. El cuarto tiempo de observación fue 36 horas después de haber ingerido té de coca, la probabilidad de que el evento sea observado al menos 36 horas después de haber ingerido té de coca es de 0,374; en este instante de tiempo el evento ocurrió en 3 pacientes del estudio. El último tiempo de observación considerado fue de 48 horas, después de haber ingerido té de coca. La probabilidad de que el evento sea observado al menos 48 horas después de haber ingerido té de coca, es de 0.299; en este momento el evento se observó sólo en dos de los pacientes del estudio.

En consecuencia, a medida que el tiempo de observación se incrementa, la probabilidad de que ocurra el evento, resultado positivo de benzoilecgonina, disminuye considerablemente, hasta un momento en que la probabilidad de ocurrencia del evento es casi nula.

En el Gráfico Nº 1, se observa un patrón decreciente de la ocurrencia del evento, resultado positivo de benzoilecgonina, a medida que el tiempo de observación se incrementa, así como las franjas de confianza al 95% para cada intervalo de tiempo de observación. Al paciente consumir té de coca, en un instante de tiempo muy corto (incluso inferior a una hora) posterior a la ingesta, la probabilidad de que el evento ocurra es igual a uno (1). Sin embargo, la probabilidad de que el evento ocurra una hora después de ingerido té de coca, es de 0.80 (similar a los resultados mostrados en la Tabla Nº 5). La probabilidad de observar el evento a las tres horas, después de la ingesta, es de 0.60. Este patrón se mantiene constante hasta las 24 horas de observación. Similarmente ocurre entre las 24 y 36 horas de observación, hasta que finalmente después de las 48 horas desaparece la supervivencia de benzoilecgonina en las muestras de orina del paciente, cuya probabilidad sería inferior a 0.299.

Gráfico 1

Función de supervivencia estimada de Kaplan y Meier
Evento: resultado positivo de benzollecgonina

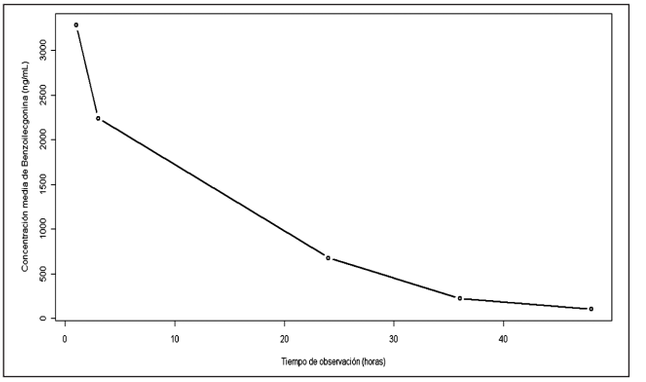


La Tabla Nº 6, muestra los resultados de las concentraciones (ng/mL) de benzoilecgonina, obtenidas en las muestras de orina de los voluntarios después de ingerir la infusión de té de coca, mediante el método semicuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite (FPIA). De cada paciente se realizaron tres (3) determinaciones en cada instante de tiempo y se obtuvo la media aritmética de cada uno. En la Tabla se puede apreciar que las mayores concentraciones de benzoilecgonina resultaron en la micción de la 1era hora (a excepción del voluntario 1) y las 3 horas. Se puede observar en los voluntarios 3 y 5 concentraciones de benzoilecgonina mayores a 5.000 ng/mL en la micción de la primera hora, y en estos al igual que en todos los voluntarios se aprecia como las concentraciones de benzoilecgonina van decreciendo con el transcurrir de las horas de estudio (excepto en el voluntario 1), detectándose en los voluntarios 7 y 8 antes de las 24 horas concentraciones de benzoilecgonina muy por debajo de las encontradas en el resto de las muestras, resultando a las 48 horas posteriores a la ingestión de la infusión de té en todos los voluntarios las concentraciones de benzoilecgonina en orina por debajo del cut-off, detectándose las más altas concentraciones de benzoilecgonina (mayor a 300 ng/mL) en la orina de los voluntarios 2 y 3 al finalizar el estudio.

Esta situación también la podemos observar en el Gráfico 2. Allí se aprecia que el método semi-cuantitativo nos indica que una vez ingerida la infusión de té de coca, las concentraciones de Benzoilecgonina (ng/mL) disminuyen considerablemente en el tiempo.

Gráfico 2

Resultados del análisis por el método cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite, de las concentraciones de Benzoilecgonina (ng/mL) en la orina de los voluntarios después de ingerir la infusión de té de coca (Nasa Esh's Coca Nasa)



Mediante los Gráficos 1 y 2, se muestran los resultados obtenidos a partir de la aplicación de los métodos de inmunoensayo, cualitativo y semi-cuantitativo, respectivamente. Ahora bien, mediante la aplicación del método estadístico Kappa, estratificado para cada instante de tiempo, se determinó que ambos métodos son concordantes, tal como se muestra en la Tabla 7.

El Coeficiente Kappa está basado en la hipótesis nula de que, los métodos semicuantitativo y cualitativo no son equivalentes. El criterio de decisión es en función de un nivel de significación del 5%. Si p_valor es menor a 0.05 ($p < 0.05$) se rechaza la hipótesis nula. En

Tabla Nº 6

Resultados de las concentraciones (ng/mL) de benzoilecgonina, obtenidas en las muestras de orina de los voluntarios después de ingerir la infusión de té de coca, mediante el método semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite (FPIA)

	Pacientes									
Tiempo	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1	590	4386	> 5000	4726	> 5000	3354	1859	2055	4279	4097
3	1044	3146	> 5000	3159	3933,2	2981	1338	1606	4022	2258
24	1743	1524	1940	751	986,63	613	207	263	1459	850
36	284	1353	1423,5	421	288,1	230	112	198	289	290
48	53,1	1215	890,15	205	70,7	53,1	40,2	128	143	160

Fuente: Laboratorio de Toxicología Analítica dependiente de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, ubicado en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA). Mérida-Venezuela.

Tabla Nº 7

Comparación de los métodos semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite y cualitativo Acu-check, mediante el Coeficiente Kappa, para la determinación de cocaina en orina de pacientes voluntarios, después de ingerir la infusión de té de coca (Nasa Esh's Coca Nasa).

		M. Cualitativo				
Tiempo	**M. Semicuantitativo**	**Positivo**	**Negativo**	**Total**	**Coef. Kappa**	**p_valor**
1	≥ 300 ng/mL < 300 ng/mL Total	10 0 10	0 0 0	10 0 10	•	•
3	≥ 300 ng/mL < 300 ng/mL Total	10 0 10	0 0 0	10 0 10	•	•
24	≥ 300 ng/mL < 300 ng/mL Total	8 0 8	0 2 2	8 2 10	1	0.002
36	≥ 300 ng/mL < 300 ng/mL Total	3 0 3	0 7 7	3 7 10	1	0.002
48	≥ 300 ng/mL < 300 ng/mL Total	2 0 2	0 8 8	2 8 10	1	0.002

Fuente: Laboratorio de Toxicología Analítica dependiente de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, ubicado en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA). Mérida-Venezuela.

este caso particular, p_valor es igual a 0.002, menor a 0.05 (p = 0.002 < 0.05), entonces se puede concluir que los métodos semi-cuantitativo y cualitativo son equivalentes para determinar presencia de benzoilecgonina en orina de pacientes consumidores de té de coca. Además, el valor del Coeficiente Kappa es igual a uno (1), lo que se interpreta como una concordancia excelente entre los métodos, cualitativo Acu-check y semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite (FPIA).

DISCUSIÓN

Se puede apreciar en los resultados que al procesar las muestras de orina de los 10 voluntarios antes de ingerir la infusión de te de coca (Nasa Esh´s Coca Nasa), al ser analizadas tanto por el método cualitativo Acu-check y semicuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite, se demostró que no se obtuvieron resultados falsos positivos al ser comparados los resultados por ambos métodos. En un estudio realizado por Expósito y col (23) para evaluar la validez del test rápido Ontrak Teststik para detectar cocaína y marihuana, realizaron determinaciones en muestras de orina libres de droga, demostrando que no se obtuvieron falsos positivos con Ontrak Teststik al comparar los resultados con los arrojados por FPIA-TDx y con ELISA, demostrando así una mayor confiabilidad de la validez del test.

Por otra parte, al realizar las determinaciones con el método cualitativo Acu-check utilizando los calibradores del método semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite (FPIA), se aprecia que al procesar el calibrador A de concentración 0 ng/mL resultó negativo para Acu-check, mientras que con los calibradores B, C, D, E y F con concentraciones iguales o superiores de 300 ng/mL resultaron positivos, a diferencia de los resultados obtenidos

por Expósito y col (23) en la evaluación del test rápido Ontrak TesTstik para detectar cocaína y marihuana en muestras de orina, al utilizar el calibrador de 300 ng/mL correspondiente al método Elisa, el Ontrak Teststik arrojó resultado negativo, siendo esa la concentración de cut-off establecida por el fabricante de este test.

Al analizar las muestras de los 10 voluntarios por el método cualitativo Acu-check, luego de la ingestión de té de coca (Nasa Esh´s Coca Nasa), se puede observar que se obtienen resultados positivos en el análisis de las orinas recolectadas en la primera, 3, 24, 36 y las 48 horas posteriores a la ingestión de dicho té, ello con diversas variaciones de persistencia entre las muestras, estos hallazgos se asemejan con los obtenidos por Zabaleta y Castro (6) en su estudio al analizar con el ensayo cualitativo comercial inmunoquímico de un solo paso SureStep COC, muestras de orina de voluntarios adultos sanos, que ingirieron infusión de mate de coca (Delisse, ENACO, Perú) recolectadas a las 3, 6, 12, 48 y 72 horas, en el cual se obtuvieron resultados positivos en la orina de todos los sujetos, detectándose la presencia de benzoilecgonina entre las 3 y 24 horas y la orina se negativizó a las 48 horas en todos los sujetos.

Los resultados positivos preliminares obtenidos utilizando el método cualitativo de Acu-check, coinciden con los resultados obtenidos por el método semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite (FPIA), con el mismo se puedo detectar concentraciones de benzoilecgonina en las muestras de orina de voluntarios después de la ingestión de té de coca, en todos los rangos de concentraciones, inclusive en el de mayor concentración (> 5000 ng/mL), a diferencia de los resultados encontrados en un estudio realizado por Galassi y col (10) los cuales utilizaron Coat-a-Count metabolitos de la cocaína, un radio inmuno análisis diseñado para la determinación cuantitativa de benzoilecgonina en orina, para analizar muestras de personas que consumieron té de coca, hallando con el mismo valores de benzoilecgonina en todos los rangos de concentración menos en el último, que corresponde al de mayor concentración de 5001-6000 ng/mL.

Se observa que mediante el método semicuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite (FPIA), la concentración de benzoilecgonina en la muestra de orina del voluntario 1 en la primera micción fue menor que las concentraciones de benzoilecgonina obtenidas en la micción a las 3 horas y a las 24 horas esto ya que el voluntario 1 realizó la 1era micción un poco antes de la media hora de la toma de la infusión de té de coca, a diferencia de los demás voluntarios, resultado que se deba probablemente a que la detección de benzoilecgonina en orina se hace positiva entre los 30 a 45 minutos de la administrada, sea la hoja de coca, la cocaína y/o mate de coca (1), y considerando que la concentración máxima en plasma de cocaína en hojas de coca es de 60 minutos (2), además, se aprecia que en los voluntarios 2 y 3 se mantienen concentraciones de benzoilecgonina muy por encima del cut-off hasta las 48 horas, evidenciándose diferencias de concentración de benzoilecgonina en orina entre cada uno de los voluntarios involucrados en el estudio, lo cual pudiera estar relacionado con el metabolismo de la persona así como a su ingestión de líquidos, más que a la concentración o cantidad de mate o droga consumida (1), a su vez, se deben considerar otros factores que pueden afectar la concentración de cocaína y sus metabolitos en las muestras de orina, como el volumen de ingestión de fluidos antes de proporcionar la muestra de orina y la hidrólisis química que ocurre en ésta antes del análisis (12), además de ello, de acuerdo a la cinética de la cocaína, la variabilidad individual es muy grande, en el rango de los 30 a los 120 minutos en diferentes individuos (24), es decir, cada individuo tiene su velocidad de eliminación de cocaína, ello determinado en buena parte por la concentración o la actividad de sus colinesterasas, las cuales participan en dos vías de degradación de la cocaína, a metiléster de ecgonina y a benzoilecgonina (25).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos con los métodos utilizados en este estudio piloto, se detectó benzoilecgonina en las muestras de orina de consumidores de té de coca (Nasa Esh´s Coca nasa).

Mediante el método cualitativo Acu-chek se obtuvo resultados positivos para benzoilecgonina en muestras de orina de consumidores de té de coca (Nasa Esh´s Coca Nasa) desde la primera hora hasta las 48 horas del estudio, coincidiendo este resultado con el obtenido mediante el método semi-cuantitativo AxSYM Cocaine Metabolite (FPIA), con el cual se pudieron detectar variaciones de concentraciones de benzoilecgonina entre cada uno de los voluntarios del estudio.

RECOMENDACIONES

Considerando los resultados obtenidos, se recomienda realizar estudios posteriores con la implementación de métodos más específicos con la finalidad de encontrar parámetros que permitan discriminar un individuos que haya ingerido infusión de té de coca, de un adicto a la cocaína, en virtud que los métodos utilizados en este estudio piloto proporcionan sólo resultados analíticos preliminares. A su vez, es importante prevenir a los consumidores de té de coca sobre el riesgo de la detección benzoilecgonina en su orina dentro de la primera a 48 horas de la ingesta, y las implicaciones que trae consigo tales hallazgos de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Alcaráz Del Castillo F, Zuazo J.¿Es posible diferenciar analíticamente un consumidor de coca de uno de cocaína? Adicciones. 2005; 17(1):61-69.

(2) Botero M. Embriaguez no alcohólica. Enfoque medicoforense. En: Toxicología. Bogotá, Colombia: El Manual Moderno, 2001, p. 413-432.

(3) Lizasoain I, Moro M. Cocaína (I).Farmacología. Intoxicación aguda. En: Drogodependencias. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.1998, p.113-122.

(4) Lizasoain I, Moro M. Cocaína (II).Dependencia. Síndrome de abstinencia. En: Drogodependencias. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana. 1998, p.123-133.

(5) Usos y abusos de la coca. Disponible en: http://www.apehcoca.org/index.php?option=com_content&task=view&id=58& Itemid=81(Consultado el 04.10.09).

(6) Zabaleta, A, Castro de la Mata R. Detección de metabolitos de cocaína en orina de consumidores de mate de coca. Psicoactiva. 2001:19: 3-5.

(7) Bolo L, Ocampo P. Mate de coca y episodio depresivo. Medicina naturista. 2004; 5: 223-232.

(8) Pérez T, Patiño N. Manual para el análisis toxicológico en el laboratorio de urgencias. Bogotá, Colombia. 2009. p. 58-63.

(9) Lizasoain I, Moro M, Lorenzo P. Cocaína: aspectos farmacológicos. Adicciones. 2002; 14 (1):57-64.

(10) Galassi F, Ramírez E, Prada G. Comparación entre el contenido de benzoilecgonina en orina de: bebedores de te de hojas de coca y de coqueadotes con el de adictos. Universidad Nacional Del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, 2006.

(11) Expósito de Goikoetxea CL. Cromatografía en capa fina y espectrofotometría en luz ultravioleta: validez actual y aplicabilidad para detectar cocaína o benzoilecgonina en orinas de pacientes farmacodependientes en proceso de rehabilitación. Rev. Fac. Med. 2003; 26 (1):49-54.

(12) Comparación de inmunoensayos para la medición semicuantitativa de la benzoilecgonina en la orina. Disponible en: http:/www.cij.gob.mx/Paginas/Menulzquierdo/.../Comparacion.pdf (Consultado el 13.11.09)

(13) Tóxicos en orina. Disponible en: www. Aebm.org/Jornada/…/DROGAS%20DE%20ABUSO…pdf

(14) Ecgonina. De Wikipedia, la enciclopedia libre. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Ecgonina. (Consultado el 15.03.10).

(15) La cocaína y el deporte. Efectos nocivos y aspectos psicológicos. Disponible en: http:/ www. portalesmedicos.com/publicaciones/articles/639/1/La-cocaina-y-el-deporte-Efectos-nocivos-y-aspectos-Psicologicos.html. (Consultado el 10.11.09).

(16) http://www.delisse.ec/coca_mate_de_coca_nasa_esh_20.htm (Consultado el 17.03.10).

(17) Acu-check. Cocaína/Benzoilecgonina. Prueba de un solo paso. Para Venezuela – Registro Sanitario No PMP-10099.

(18) AxSym Cocaine Metabolite. REF 3B24-20. Abbott Laboratorios. USA.2005.

(19) Introducción a los Inmunoensayos. Disponible en: http:/ www.abbottdiagnostics.es/ciencia/pdf/1_d.pdf-. (Consultado el 07.11.09).

(20) Torres V, Casabó V, Sancho V. Farmacocinética clínica. España: AFAHPE;1997.

(21) Kleinbaum D. Survival Analysis: A self-learning Text. New York: Springer-Verlag, 1995.

(22) Hernández R. Contribuciones al análisis estadístico: El Coeficiente de Validez de Contenido (Cvc) y el Coeficiente Kappa, en la determinación de la validez de contenido según la técnica de juicio de expertos. Universidad de los Andes, Mérida-Venezuela. 2002.

(23) Expósito C. Evaluación del test rápido Ontrax Teststik para detectar cocaína y marihuana en muestras de orina. Rev. Fac. Med. 2001; 24 (2): 157-162.

(24) Farmacocinética de la cocaína: consideraciones para evaluar el uso de cocaína por medio del análisis de orina. Disponible en: www.cij.gob.mx/paginas/ Menulzquierdo/…Farmacocinética.pdf . (Consultado el 15.03.10).

(25) Ortega A. ¿Estaba intoxicado por cocaína este individuo? (I): estimaciones basadas en la farmacocinética de la droga. Cuadernos de Medicina Forense. 2003; 33:5-12.

Recibido: 25 de noviembre de 2009 / Aprobado: 03 de mayo de 2010