



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Química

**DETERMINACIÓN DE COCAÍNA POR
ESPECTROMETRÍA VIBRACIONAL**

Clara María Pérez Alfonso

Directores

Dr. Salvador Garrigues Mateo

Dr. Miguel de la Guardia Cirugeda

Valencia, marzo de 2017

La Tesis Doctoral *Determinación de Cocaína por Espectrometría Vibracional* que presenta **D^a Clara María Pérez Alfonso** ha sido realizada bajo la dirección de los Profesores **Dr. Salvador Garrigues Mateo** y **Dr. Miguel de la Guardia Cirugeda**, en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia, que **AUTORIZAN** su presentación para optar a la obtención del Grado de Doctora por la Universitat de València.

Dr. Salvador Garrigues Mateo

Dr. Miguel de la Guardia Cirugeda

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a cuantas personas han hecho posible que esta Tesis Doctoral se haya podido realizar:

En primer lugar, a mis directores Salvador Garrigues y Miguel de la Guardia , por todo lo que he tenido la oportunidad de aprender de ellos en todos estos años, que ha sido mucho; por haber confiado en mí y haber estado dispuestos a ayudarme en cualquier momento, no sólo para la realización de los estudios que componen esta Tesis Doctoral, sino también en las dificultades que han podido surgir en mi trabajo diario como perito del Laboratorio de Control de Drogas, para lo cual siempre me han sido de gran ayuda.

Al Cabo Primero de la Guardia Civil Juan Bravo, por todo lo que me ha enseñado, por su ayuda para la recopilación de documentación y muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral y sobre todo, por su apoyo y amistad.

A los jueces que han colaborado en las autorizaciones de traslado de muestras para poder realizar las investigaciones incluidas en esta Tesis Doctoral.

A mi hermana María Jesús, por su ayuda en la revisión del texto y el formato de esta Tesis Doctoral.

A mis compañeras de profesión y amigas Ana Cuesta y Ángela Yanini, por sus ánimos y su apoyo en los momentos difíciles.

A mi familia, por su cariño, paciencia y apoyo.

A todos, Gracias.

A mi madre

ACRÓNIMOS

ANNA: *Artificial Neural Network Analysis.* Análisis de Redes Neuronales Artificiales.

ATR: *Attenuated Total Reflectance.* Reflexión Total Atenuada.

CITCO: Centro de Inteligencia contra el Terrorismo y el Crimen Organizado.

CLS: *Classical Least Squares.* Mínimos Cuadrados Clásicos.

DEA: *US Drug Enforcement Administration.*

DR: *Diffuse Reflectance.* Reflexión Difusa.

EMCDDA/OEDT: *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.* Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías.

FID: *Flame Ionization Detector.* Detector de Ionización de Llama.

FIR: *Far Infrared.* Infrarrojo Lejano.

GC: *Gas Chromatography.* Cromatografía de Gases.

HCA: *Hierarchical Cluster Analysis.* Análisis de Conglomerados.

HS: *Head space.* Espacio de cabeza.

IARC: *International Agency for Research on Cancer.* Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer.

ILS: *Inversal Least Squares.* Mínimos Cuadrados Inversos.

JIFE: Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes.

KNN: *k-Nearest neighbor.* k-Vecinos más próximos.

LDA: *Linear Discriminant Analysis.* Análisis Discriminante Lineal

LOO: *Leave-one-out.* (Estrategia empleada en la validación cruzada).

LV: *Latent Variable.* Variable Latente o Factor.

MIR: *Middle Infrared.* Infrarrojo Medio.

MS: *Mass Spectrometry.* Espectrometría de Masas.

MSC: *Multiple Scatter Correction.* Corrección de Dispersión Múltiple.

MSECV: *Mean Square Error of Cross Validation.* Error Cuadrático Medio de Validación Cruzada.

MSEP: *Mean Square Error of Prediction.* Error Cuadrático Medio de Predicción.

NIR: *Near Infrared.* Infrarrojo Cercano.

NPS: *New Psychoactive Substances.* Nuevas Sustancias Psicoactivas.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ONU: Organización de Naciones Unidas.

PCA: *Principal Component Analysis.* Análisis de Componentes Principales.

PCR: *Principal Component Regression.* Regresión sobre Componentes Principales.

PLS-DA: *Partial Least squares-Discriminant Analysis.* Mínimos Cuadrados Parciales-Análisis Discriminante.

PLSR: *Partial Least Squares Regression.* Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales.

PNN: *Probabilistic Neural Network.* Red Neuronal Probabilística.

RMSEE: *Root Mean Square Error of Estimation.* Raíz Cuadrada del Error Cuadrático Medio de Estimación.

RMSECV: *Root Mean Square Error of Cross Validation.* Raíz Cuadrada del Error Cuadrático Medio de Validación Cruzada.

RMSEP: *Root Mean Square Error of Prediction.* Raíz Cuadrada del Error Cuadrático Medio de Predicción.

RSD: *Relative Standard Deviation.* Desviación Estándar Relativa.

SVM-DA: *Support Vector Machine - Discriminant Analysis.* Algoritmo de Soporte Vectorial - Análisis Discriminante.

SWGDRUD: *Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs.* Grupo Científico de Trabajo para el Análisis de Drogas Incautadas.

UNODC: *United Nations of Drugs and Crime.* Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito.

INDICE

1.Objetivos.....	1
2.Introducción general.....	3
2.1 Evolución del <i>status</i> legal de la cocaína hasta su fiscalización internacional.....	3
2.2 Producción ilícita de cocaína.....	12
2.3 Formas de presentación de la cocaína.....	20
2.3.1 Cocaína en polvo.....	20
2.3.1.1 Cocaína en polvo adulterada	22
2.3.2 Disoluciones de cocaína.....	29
2.3.3 Cocaína impregnada en tejidos y otros soportes	30
2.3.4 Cocaína en polvo mezclada con sustancias que interfieren en su detección	31
2.4 Extracción de la cocaína de las diferentes matrices.....	33
2.5 El análisis forense de muestras decomisadas de cocaína.....	35
2.6 Pruebas presuntivas de identificación de cocaína.....	37
2.7 Técnicas instrumentales empleadas en la determinación de cocaína.....	39
2.7.1 Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)	39
2.7.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	42
2.7.3 Espectroscopia IR.....	46
2.7.3.1. Espectroscopia ATR-MIR	49
2.7.3.2 Espectroscopia DR-NIR.....	52
2.8 Tratamiento matemático de los espectros IR a través del empleo de la quimiometría.....	55
2.8.1 Métodos de clasificación y reconocimiento de pautas	55
2.8.1.1 Análisis de componentes principales (PCA).....	56
2.8.1.2 Análisis cluster o de conglomerados (HCA).....	61
2.8.2 Técnicas de regresión multivariante	62
2.9 Ejemplos de aplicaciones forenses de la espectroscopia MIR y NIR en el análisis de drogas decomisadas	69
3. Parte experimental.....	73
3.1 Instrumentación utilizada.....	73
3.1.1 Cromatógrafo de gases con detector FID	73
3.1.2 Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas.....	74
3.1.3 Espectrofotómetro FT-NIR.....	75
3.1.4 Espectrómetro FT-IR con accesorio ATR.....	76
3.1.5 Espectrofotómetro FT-IR IFS 66/vS Bruker	77
3.2 Muestras y reactivos.....	79
3.2.1 Muestras de cocaína en polvo.....	79
3.2.2 Muestras de soportes impregnados	81
3.2.3 Muestras de cocaína en disolución acuosa	83

3.2.4 Muestras de cocaína en polvo mezclada con sustancias que enmascaran el test de tiocianato de cobalto	84
3.2.5 Reactivos empleados	84
3.3 Procedimientos de referencia	85
3.3.1 Preparación de patrones y muestras.....	85
3.3.2 Análisis cualitativo de las muestras por GC-MS	86
3.3.3 Determinación del contenido en cocaína de las muestras por el método de referencia de GC-FID.....	87
3.4 Procedimientos de medida en el infrarrojo	88
3.4.1 Infrarrojo próximo (NIR).....	88
3.4.1.1 Medidas por reflexión difusa (DR-NIR) de muestras en polvo	88
3.4.1.2 Medidas por (DR-NIR) desoportes impregnados.....	89
3.4.2 Infrarrojo medio (MIR)	90
3.4.2.1 Medidas por reflexión total atenuada (ATR) de muestras en polvo	90
3.4.2.2 Medidas por reflexión total atenuada (ATR) de soportes impregnados.....	90
3.4.2.3 Medidas por reflexión total atenuada (ATR) de muestras líquidas.....	91
3.5 Desarrollo de métodos cualitativos para la determinación de cocaína y sus adulterantes	92
3.5.1 Método cualitativo para la identificación de cocaína y sus adulterantes	92
3.5.2 Método cualitativo para muestras de cocaína en disolución.....	95
3.5.3 Criterios de validación para los métodos cualitativos.....	95
3.6 Construcción y evaluación de modelos de regresión PLS y aplicación de métodos de reconocimiento de pautas.....	97
3.6.1 Evaluación de los modelos construidos	100
3.6.2 Comparación de los modelos PLS obtenidos con los métodos de referencia.....	102
4.Resultados y discusión	107
4.1 Determinación de cocaína en muestras sólidas por medida directa DR-NIR en viales de vidrio....	107
4.1.1 Espectros NIR obtenidos.....	107
4.1.2 Análisis <i>cluster</i> de los espectros (HCA).....	112
4.1.3 Construcción y evaluación de los modelos PLS-DR-NIR.....	113
4.1.4 Validación del modelo PLS-DR-NIR	118
4.2 Determinación de cocaína y sus adulterantes por ATR-MIR.....	123
4.2.1 Presencia de adulterantes en muestras de cocaína decomisadas en Valencia.....	123
4.2.2. Método ATR-MIR para la determinación de cocaína y sus adulterantes más comunes en muestras decomisadas	130
4.2.2.1 Espectro ATR-MIR de la cocaína.....	130
4.2.2.2 Modelo PLS-ATR-MIR para la determinación cuantitativa de cocaína.....	142
4.3 Determinación de cocaína mediante DR-NIR en presencia de los adulterantes más comunes.....	148
4.3.1 Comparación de los valores obtenidos para las muestras problema con los modelos PLS-ATR-MIR y DR-NIR.....	153

4.4 Determinación de cocaína en materiales impregnados.....	157
4.4.1 Espectros ATR-MIR de los materiales impregnados.....	157
4.4.2 Espectros DR-NIR de los materiales impregnados.....	161
4.4.3 Modelos PLS para la determinación de cocaína en soportes impregnados	164
4.4.4 Aplicación de los modelos obtenidos a una muestra problema	169
4.4.5 Empleo del modelo PLS-ATR-MIR en el análisis de pasta de papel impregnado.....	176
4.4.6 Determinación de cocaína en muestras con impregnación no homogénea	180
4.5 Determinación de cocaína en disoluciones acuosas por atr-mir.....	187
4.5.1 Espectros ATR-MIR	189
4.5.2 Análisis <i>cluster</i> (HCA) de los espectros obtenidos para los vinagres de frutas.....	193
4.5.3 Test de conformidad para el análisis cualitativo de cocaína disuelta.....	196
4.5.4 Modelo PLS-ATR-MIR para la determinación cuantitativa de cocaína disuelta.....	197
4.5.5 Comparación de los resultados obtenidos con los encontrados por el método de referencia	202
4.6 Caracterización de muestras de cocaína negra	205
4.6.1 Muestras de cocaína con apariencia de café	205
4.6.2 Muestras de cocaína negra compactada	215
5.Conclusiones finales.....	219
6.Bibliografía	221

1

Objetivos

Los objetivos de esta Tesis Doctoral se han centrado en el estudio y desarrollo de nuevos métodos para la determinación de cocaína en muestras decomisadas de diferente naturaleza utilizando medidas por espectroscopia infrarroja, tanto en el infrarrojo próximo (NIR) como en el medio (MIR). En particular se ha tratado de llevar a cabo desarrollos que supongan obtener las medidas de forma rápida y no destructiva, evitando la generación de residuos y eliminando los riesgos que suponen para el operador el uso de disolventes y reactivos.

La razón por la que se ha escogido la cocaína como analito de estudio se debe a que además de ser la sustancia objeto de mayor número de incautaciones después de la planta de *cannabis* y *el hachis*, es la que se encuentra en matrices más variadas y la que sufre mayor adulteración de todas las sustancias ilegales que se analizan en los laboratorios forenses y, por tanto, esto supone que se presenten un número importante de interferencias a la hora de llevar a cabo su determinación. En este sentido, se han explorado las posibilidades de la espectroscopia infrarroja como método de *screening* para el análisis de rutina de muestras sospechosas de contener cocaína y poder evaluar la presencia de sustancias adulterantes que permitan una mejor caracterización y seguimiento de las muestras aprehendidas.

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado los siguientes estudios y aplicaciones analíticas:

1. Determinación de cocaína en muestras en polvo mediante regresión PLS por medida directa DR-NIR en viales de vidrio. Trabajo original publicado en la revista *Forensic Science International* bajo el título “*A green method for the determination of cocaine in illicit samples*”, 237 (2014) 70-73 [1].
2. Determinación de cocaína y sus adulterantes en muestras sólidas mediante una rutina basada en la medida directa ATR-MIR.
3. Determinación cuantitativa de cocaína en matrices impregnadas mediante el uso de modelos PLS-ATR-MIR y PLS-DR-NIR, empleando en este último caso una sonda de fibra óptica para realizar las medidas.
4. Determinación de cocaína en muestras acuosas mediante PLS-ATR-MIR.
5. Determinación de cocaína en muestras decomisadas que contienen sustancias enmascarantes de su aspecto, mediante detección por espectroscopia ATR-MIR.

2

Introducción General

2.1 Evolución del *status* legal de la cocaína hasta su fiscalización internacional

La cocaína es una sustancia con actividad anestésica y psicoactiva que se obtiene a partir de la hoja de la planta de la coca (*Erythroxylon coca* o *Erythroxylon novogranatense*). Esta planta se cultiva principalmente en Colombia, Bolivia y Perú. En los países productores, el consumo de la hoja masticada o en forma de infusión constituye una tradición muy antigua que se ha venido utilizando para combatir el cansancio, el hambre y el llamado *mal de altura* [2].

La cocaína fue aislada por primera vez a partir de la hoja de coca en el año 1860 por el químico alemán Albert Niemann (1834-1861). En 1880 Basil Von Anrep (1852-1925) publicó los resultados de sus estudios relacionados con la aplicación de la cocaína en humanos, donde recomienda su utilización en anestesia quirúrgica. En 1884 Carl Koller (1857-1944) demostró sus beneficios como anestésico en oftalmología. William Steward Halsted (1852-1922) y su colaborador Richard John Hall (1856-1897) comenzaron sus investigaciones sobre el uso de las inyecciones de cocaína y, finalmente, desarrollaron la técnica de la anestesia regional [3]. En la actualidad todavía se utiliza en algunos países como anestésico local en cirugía ocular, del oído y de la garganta [2].

Por otro lado Sigmund Freud (1856-1939), padre del psicoanálisis y defensor del uso de esta sustancia, publicó en 1884-1885 una serie de artículos entre los que destacan “Contribución al conocimiento de los efectos de la cocaína” [4] y “Sobre la coca” [5], donde defiende el uso de esta sustancia en medicina y, paradójicamente, la recomienda para la deshabituación de adictos a la morfina. Uno de los primeros adictos a la cocaína que se conocen fue el médico austriaco Fleischl (1846-1891), íntimo amigo de Freud y adicto a la morfina, que utilizaba para combatir los fuertes dolores que sufría; siguiendo las teorías de Freud acabó convirtiéndose también en adicto a la cocaína [6].

En 1886, el farmacéutico John Pemberton (1881-1888) incluyó la hoja de coca como ingrediente en su famoso refresco *Coca-Cola*, que posteriormente tuvo que dejar de utilizar debido a la presión pública.

Por aquel entonces la comunidad científica comenzó a condenar el uso de la cocaína. Louis Lewin (1850-1929), prestigioso farmacólogo alemán y estudioso de las plantas psicoactivas, fue uno de los primeros en atacar el uso de esta sustancia; a él se le unió A. Erlenmeyer (1848-1926), médico alemán, que calificó la cocaína como “el tercer azote de la humanidad”, después del opio y el alcohol [6].

En la literatura de la época encontramos también referencias al abuso de esta sustancia. En 1888 el escritor Arthur Conan Doyle publicó “El Signo de los Cuatro”, donde Sherlock Holmes utiliza la cocaína inyectada como droga de abuso a pesar de las advertencias de Watson.

Como puede verse en los ejemplos de anuncios de la **Figura 1**, en los primeros años del siglo XX se utilizaba cocaína purificada en un gran número de tónicos y elixires preparados para tratar una amplia variedad de enfermedades, si bien es cierto que no existía ningún tipo de control sobre esta sustancia y, en general, sobre este tipo de preparados.



Figura 1. Ejemplos de anuncios de medicamentos y reconstituyentes a base de cocaína. Fuente: referencia [7,8].

La Convención Internacional del Opio fue el primer tratado internacional sobre control de drogas, firmado en 1912 en La Haya por unos pocos países, en el que se incluían medidas de control para la morfina, la cocaína y sus derivados. En 1919 se incorporó al Tratado de Versalles, firmado al final de la Primera Guerra Mundial, siendo suscrito éste por más de 50 países. Pero fue en el año 1961 cuando se ampliaron los controles sobre las sustancias estupefacientes con la firma de la Convención Única sobre Estupefacientes, entre los que se incluyó también la hoja de coca. Los países firmantes de este convenio internacional adquirieron el compromiso de tomar medidas para limitar el uso de estupefacientes únicamente a fines médicos y científicos. Para ello se estableció una cooperación y fiscalización internacional constante para este tipo de sustancias, reconociendo las partes la competencia de Naciones Unidas en materia de fiscalización internacional. Dichas competencias se desarrollaron a través del Consejo Económico y Social y la Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes (JIFE). Posteriormente, en el año 1971, se firmó el Convenio sobre Sustancias Psicotrópicas y, finalmente, en 1988 se adoptó la Convención de las Naciones Unidas contra el tráfico ilícito de

estupefacientes y sustancias psicotrópicas. Esta última convención introdujo la fiscalización también de los precursores empleados en la fabricación de drogas. Dado que muchos de ellos son sustancias con usos legales empleadas en la industria química, las empresas que los utilizan están obligadas a someterse a determinados trámites y controles administrativos.

A nivel nacional, la Ley 17/1967 de 8 de abril [9] tiene por finalidad específica la actuación de la legislación española sobre estupefacientes adaptándola a lo establecido en la Convención Única de 1961. El rigor de las medidas de fiscalización varía de un grupo de sustancias a otro en función de la capacidad para provocar adicción, de su valor terapéutico y del riesgo de su uso indebido. En función de estos parámetros las sustancias se clasifican en cuatro listas: Listas I, II, III y IV. A modo de ejemplo, la Lista I, en la que se encuentra la cocaína, es la que incluye las sustancias estupefacientes sometidas a rigurosas medidas de control.

Desde el punto de vista del consumo, en la actualidad, la cocaína es utilizada ampliamente como droga de abuso. En el *World Drug Report 2015*, elaborado por la Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (UNODC), se estima que en el mundo hay 17 millones de consumidores de cocaína y que se destinan 120.800 hectáreas al cultivo de hoja de coca [10].

El Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (OEDT/EMCDDA) ha estimado, en su informe de 2016, que un 5.1 % de la población europea entre 15 y 64 años (esto es, 17.1 millones de personas) ha consumido cocaína a lo largo de su vida y 3.6 millones (que representan el 1.1 %) lo hicieron durante el último año. Como se ve en la **Figura 2**, el porcentaje prácticamente se duplica si nos referimos a la población de jóvenes entre 15 y 34 años [11]. Además, el consumo de cocaína es el responsable en Europa de gran parte de los casos de hospitalización por problemas agudos, así como de las muertes relacionadas con el consumo de drogas. En este sentido, en el año 2012 fueron

diecinueve países europeos los que notificaron muertes relacionadas con el consumo de cocaína, habiéndose identificado más de 500 casos en total [12].



Figura 2. Consumo de cocaína entre la población europea. Informe europeo sobre drogas 2016. Fuente: EMCDDA [11].

En la actualidad, esta droga de abuso se produce casi exclusivamente en Colombia, Bolivia y Perú, desde donde es distribuida al resto de países consumidores. El abanico de métodos para transportar la cocaína a Europa es especialmente variado, donde cabe citar el desplazamiento de *camellos* o *mulas* (como vulgarmente se conoce a los traficantes a pequeña escala y a los que viajan en vuelos comerciales transportando drogas, en ocasiones en el interior de su cuerpo), el transporte aéreo comercial, el transporte marítimo, los servicios de paquetería y correo urgentes y los vuelos privados. España, Bélgica, Países Bajos, Francia e Italia totalizaron el 84 % de las 61.6 toneladas de cocaína incautadas en Europa en el año 2014. De estos países, sigue siendo España el territorio donde mayor cantidad de cocaína se incauta [11]. En los gráficos A y B de la **Figura 3** se puede observar como la tendencia en la cantidad incautada se mantiene desde 2002 y como España es también el país líder en el año 2015 en cuanto a número de incautaciones.

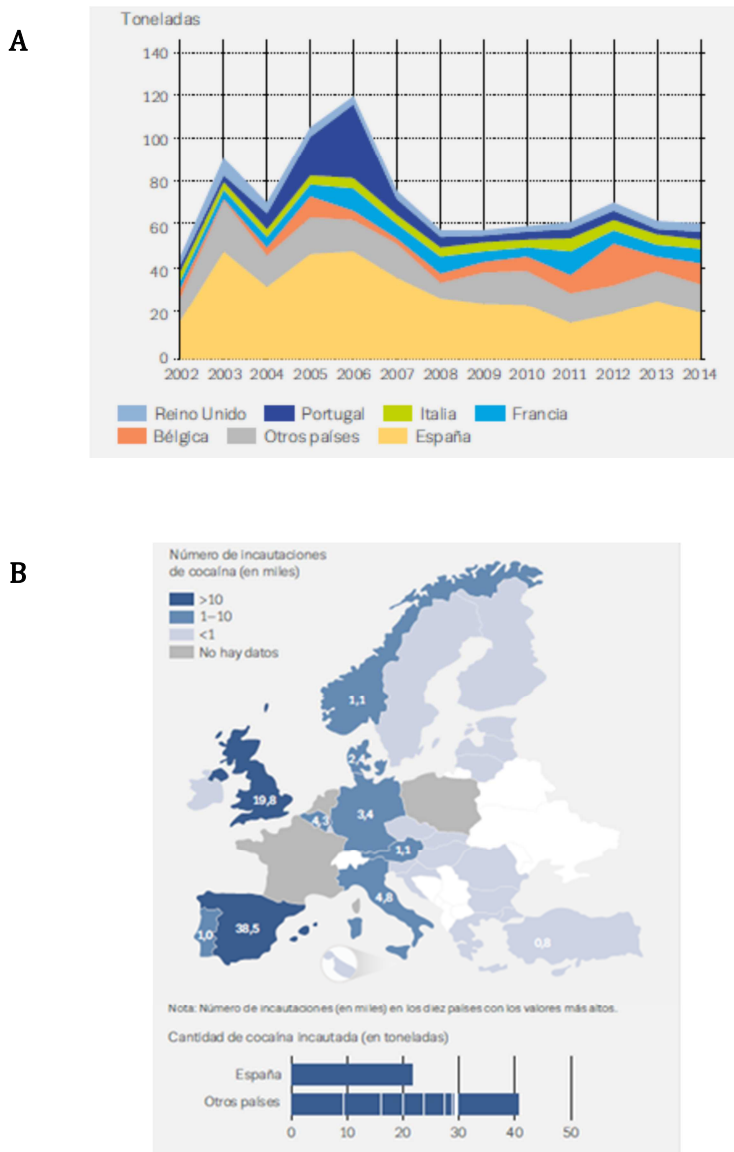


Figura 3. A. Gráfico con las cantidades de cocaína incautadas ente los años 2002 a 2014 por países en Europa (en toneladas). B. Distribución por países del número de incautaciones realizadas (en miles). Fuente: referencia [11].

De las dos formas de cocaína disponibles en Europa (**Figura 4**), la menos común es el *crack* (base libre) mientras que la más habitual es el polvo de cocaína (sal clorhidrato), que suele presentarse en forma de polvo blanco [13].



Figura 4. Muestra de cocaína en polvo y crack. Fuente: Informe Cocaína. OEDT-Europol [13].

Combinada con la cocaína encontramos dos grupos principales de sustancias: los diluyentes y los adulterantes. Los diluyentes son sustancias inactivas que se utilizan para incrementar el peso, dar consistencia o facilitar la absorción de la droga. Algunos ejemplos de este tipo de sustancias son el manitol, la glucosa o la lactosa. Por su parte, los adulterantes imitan o potencian el efecto de la droga [14] y suelen añadirse a las dosis preparadas para el consumo. Éste es el caso de sustancias como la fenacetina, la tetracaína, la cafeína o el levamisol, entre otras. Hasta hace poco tiempo, la adulteración era menos frecuente en el material sometido a tráfico internacional, cuyo contenido en cocaína alcanzaba de un 80 a un 90 % de riqueza (referido a la base) [2], pero esta tendencia ha cambiado ya que en la actualidad aparece el levamisol como adulterante en la mayoría de la cocaína a granel incautada [15].

El tráfico de estupefacientes está considerado en el Código Penal Español como un delito contra la salud pública [16]. El artículo 368 establece: *“Los que ejecuten actos de cultivo, elaboración o tráfico, o de otro modo promuevan, favorezcan o faciliten el consumo ilegal de drogas tóxicas, estupefacientes o sustancias psicotrópicas, o las posean con aquellos fines, serán castigados con las penas de prisión de tres a nueve años y multa del tanto al triplo del valor de la droga objeto del delito si se tratare de sustancias o productos que causen grave daño a la salud, y de prisión de uno a tres años y multa del tanto al duplo en los demás casos”*.

La determinación de la riqueza de la sustancia fiscalizada, así como de la presencia de otras sustancias adulterantes, resulta fundamental tal como recoge el artículo 369 del Código Penal, ya que la pena prevista se agrava en el caso que se superen las cantidades denominadas de “*notoria importancia*” o cuando la sustancia fiscalizada vaya acompañada de otras que potencien su toxicidad y, por tanto, incrementen el daño sobre la salud [16]. Según el Acuerdo del Pleno de la Sala 2ª del Tribunal Supremo de 19 de noviembre del 2001, la agravante específica de “*notoria importancia*” se determina a partir de las 500 dosis referidas al consumo diario de cada una de las sustancias según Informe del Instituto Nacional de Toxicología de 18 de octubre de 2001. En el caso de la cocaína dicha cantidad se establece en 750 gramos [17].

En cuanto a la punibilidad del tráfico a pequeña escala, que representa el 60 % de todas las detenciones por tráfico de estupefacientes, se tiene en cuenta la “*dosis mínima psicoactiva*” así como que la cantidad intervenida supere un mínimo establecido, ya que en el Código Penal Español no se considera punible la posesión de ciertas cantidades de las sustancias estupefacientes consideradas para consumo propio. La “*dosis mínima psicoactiva*” es la mínima cantidad necesaria de una sustancia que tenga las propiedades establecidas en la definición de droga dada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), esto es: “*Toda sustancia que introducida en el organismo por cualquier vía de administración, produce una alteración de algún modo del natural funcionamiento del sistema nervioso central del individuo y es, además, susceptible de crear dependencia, ya sea psicológica, física o ambas*”. La “*dosis mínima psicoactiva*” para cada una de las sustancias fiscalizadas la establece el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. En el caso de la cocaína es de 50 mg de cocaína base [18]. Las cantidades mínimas establecidas para consumo propio por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses están calculadas considerando el supuesto de posesión para cinco días de consumo. En el caso de la cocaína el consumo diario está establecido en 1.5 g y

la cantidad mínima para consumo propio es, por tanto, de 7.5 gramos de cocaína base [18].

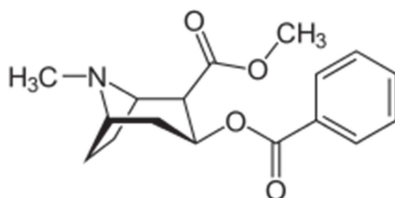
En las causas penales, los informes periciales acerca del valor de las sustancias intervenidas son elaborados por las fuerzas aprehensoras. El informe del año 2015 del Observatorio Español de las Drogas y las Toxicomanías (OEDT) [19] establece un precio medio para el gramo de cocaína en España de 57.57 euros, si bien es cierto que dicho valor es cambiante a nivel mundial y depende de diversos factores [20].

Los Laboratorios Nacionales de Control de Drogas son los encargados de elaborar los informes periciales relativos a la naturaleza y composición de las sustancias decomisadas por los Cuerpos y Fuerzas de Seguridad del Estado. Los procedimientos analíticos que se aplican en estos centros están basados, principalmente, en las “Recomendaciones para el análisis de las sustancias fiscalizadas” de la UNODC [2]. Dichas recomendaciones se extienden también al muestreo y a la implantación de un sistema de Garantía de Calidad en los laboratorios que asegure el correcto funcionamiento de los mismos. Por otro lado, el *Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs* (SWGDRUG), dependiente de la Administración de Estados Unidos, también elabora recomendaciones a tener en cuenta relativas a los criterios de muestreo y a los métodos de análisis, entre otros [21,22].

En las siguientes secciones de esta Introducción se presentan y comentan aspectos tales como el procedimiento habitual de obtención de cocaína, así como las herramientas disponibles para su identificación, análisis y control.

2.2 Producción ilícita de cocaína

El proceso de obtención de la cocaína está íntimamente ligado a sus propiedades físico-químicas, especialmente a los datos de solubilidad de la cocaína base y del clorhidrato en diferentes disolventes (**Figura 5 / Tabla 1**).



COCAÍNA

Sinónimos:

[1R-(*exo,exo*)-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-éster metílico del ácido carboxílico.

3 β -hidroxi-1 α H, 5 α H-tropano-2 β -benzoato del éster metílico del ácido carboxílico.

Benzoato del éster metílico de ecgonina.

l-cocaína.

β -cocaína.

Benzoilmetilecgonina.

C₁₇H₂₁NO₄; Peso molecular= 303.4 (base) 339.8 (clorhidrato).

Punto de fusión= 98° C (base); 195° C (clorhidrato).

Figura 5. Molécula de cocaína base y sus principales características fisicoquímicas. Fuente: referencia [2].

Tabla 1. Solubilidad de las dos formas de la cocaína en diferentes disolventes. Datos obtenidos de la referencia [2].

Disolvente	Solubilidad (1g/ml)	
	Cocaína base	Cocaína clorhidrato
Agua	Ligeramente soluble (1 en 600)	Soluble (1 en 0.4)
Etanol	Soluble (1 en 6.5)	Soluble (1 en 3.2)
Éter dietílico	Soluble (1 en 3.5)	Prácticamente insoluble
Cloroformo	Soluble (1 en 0.7)	Soluble (1 en 2.5)

Además de la cocaína existen otros alcaloides también presentes en la hoja de coca, relacionados estructuralmente con ésta, como son la cinamoilcocaína, metilecgonina, benzoilecgonina, ecgonina, norcocaína, ácido cinámico (-trans) y N-formilnorcocaína, cuyas estructuras pueden verse en la **Figura 6** [2].

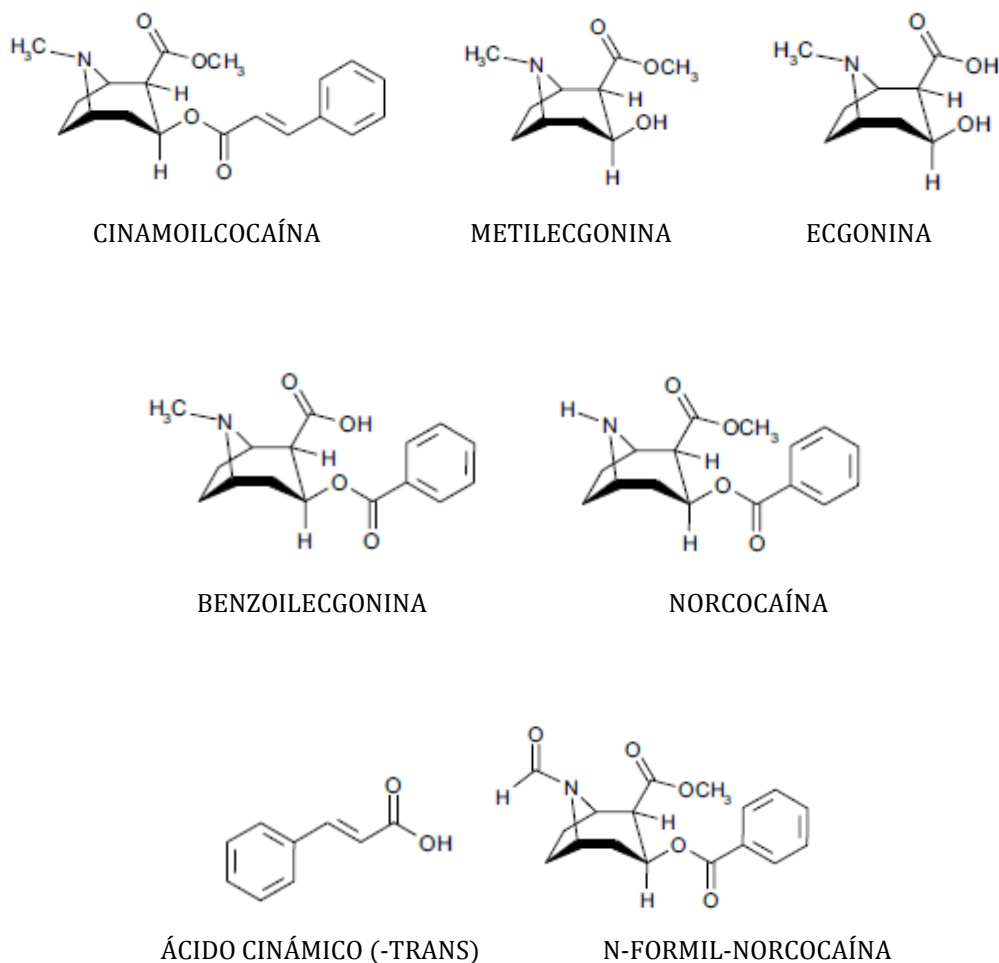


Figura 6. Alcaloides presentes en la hoja de coca relacionados estructuralmente con la cocaína. Fuente: referencia [2].

La cantidad de cocaína presente en las hojas depende de la variedad de *Erythroxylon* y, en general, se sitúa entre un 0.1% y un 1 %. En la **Tabla 2** se indican los contenidos de alcaloide para tres de las variedades de este arbusto.

Tabla 2. Contenidos habituales de cocaína para tres de las variedades de *Erythroxylon*. Fuente: referencia [2].

<u>Variedad de <i>Erythroxylon</i></u>	<u>Contenido normal en cocaína de la hoja seca</u>
<i>Erythroxylon coca</i> variedad <i>ipadu</i>	0.11-0.41 %
<i>Erythroxylon novo</i> variedad <i>novogranatense</i>	0.17-0.76 %
<i>Erythroxylon novo</i> variedad <i>truxillense</i>	0.42-1.02 %

Para obtener 1 kilo de pasta de coca se requiere como mínimo de 100 a 125 kilos de hoja de coca. La pasta de coca es un producto intermedio en el proceso de producción de cocaína con aspecto de polvo de color blanco apagado, cremoso o pajizo, de olor característico, que a menudo contiene grumos y generalmente se presenta húmedo [2]. Este producto intermedio deberá ser sometido a un proceso de purificación para obtener la cocaína base.

Debido a la dificultad de transportar de forma discreta las grandes cantidades de hoja que son necesarias para la producción de cocaína a lugares donde llevar a cabo su procesamiento, las primeras etapas del proceso de elaboración se realizan cerca de las plantaciones, en los llamados “laboratorios de extracción primaria”. En la **Figura 7** se muestra la imagen de uno de estos laboratorios de procesado [23].



Figura 7. Laboratorio de extracción primaria ubicado en la selva. Fuente: referencia [23].

La producción ilícita de cocaína puede llevarse a cabo a partir de diferentes vías. En la **Figura 8** se muestra, a modo de ejemplo, la que describe la UNODC en su Manual de Recomendaciones [2].

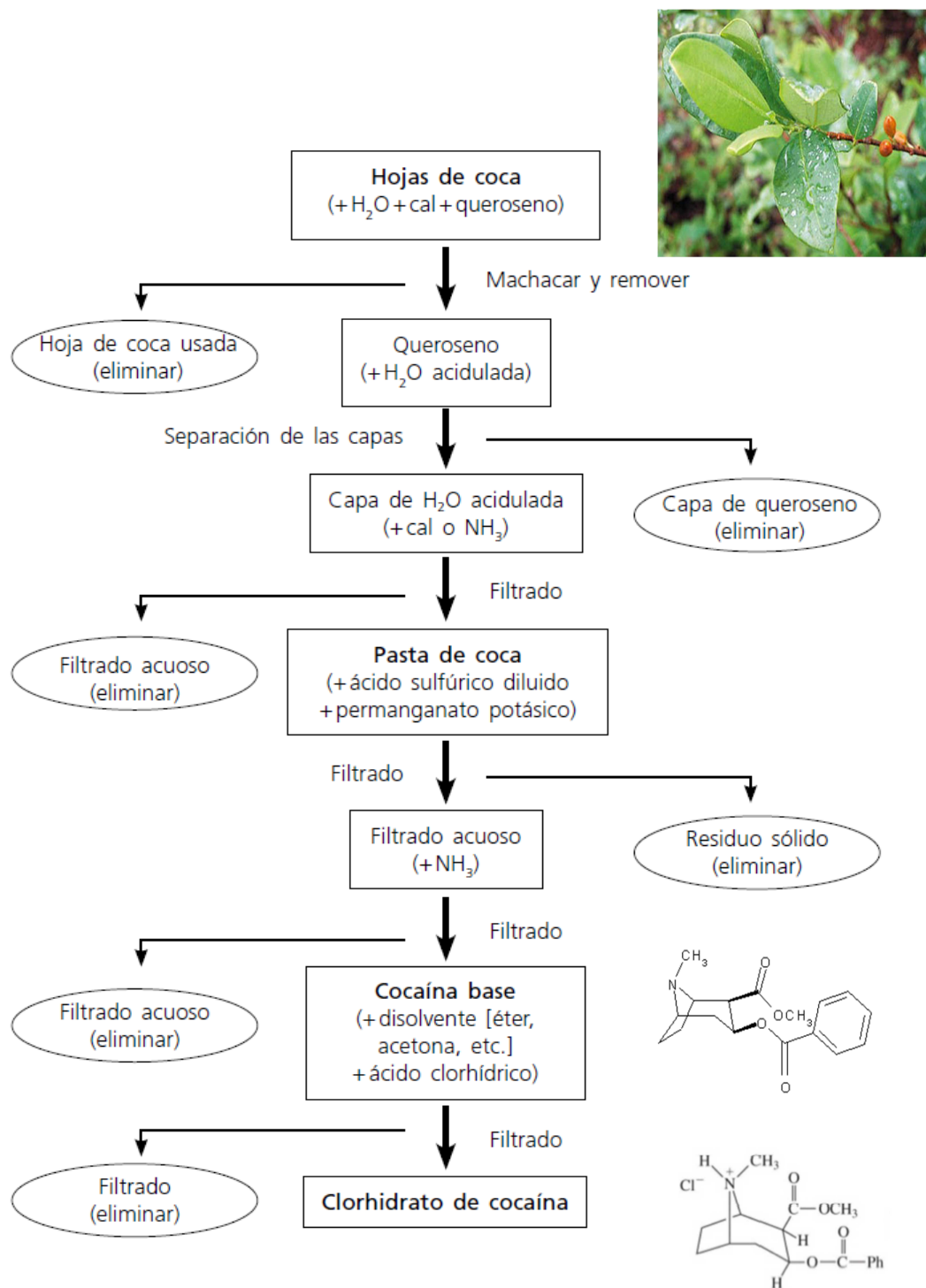


Figura 8. Esquema detallado del proceso de producción ilícita de cocaína a partir de las hojas de coca. Fuente: UNODC [2].

Durante el proceso de obtención de la cocaína, la pasta de coca inicialmente extraída a partir de las hojas se trata con una sustancia oxidante con la finalidad de transformar mediante oxidación los alcaloides no deseados y posteriormente separarlos y eliminarlos por filtración. El producto resultante se lava con una disolución alcalina y, después de filtrarlo, se lava de nuevo con agua y se seca, obteniendo la cocaína base [23]. Un esquema simplificado de ambos procesos puede verse en las **Figuras 9 y 10**.



Figura 9. Proceso de extracción y lavado para la obtención de la pasta de coca e imagen de un picadero de hoja. Fuente: referencia [23].

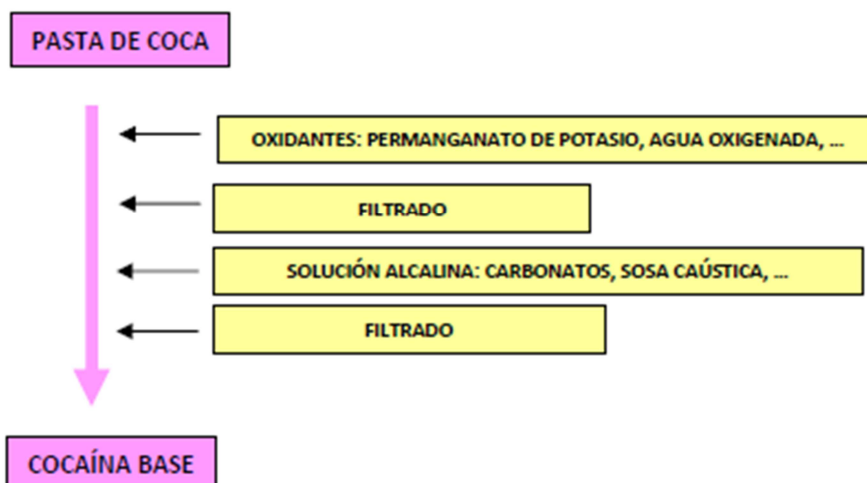


Figura 10. Proceso de oxidación y lavado para la obtención de la cocaína base a partir de la pasta de coca. Fuente: referencia [23].

El producto obtenido inicialmente debe purificarse, por lo que se trata con un disolvente adecuado, como pueda ser éter dietílico, acetona o similar (**Figura 11**). El tipo de disolvente utilizado en esta etapa va a depender de su disponibilidad, que suele ir en función del nivel de fiscalización del mismo en el país de origen, ya que algunos disolventes están sometidos a ciertos controles, bien a través de la Convención de Naciones Unidas de 1988 o de las propias normas nacionales. Finalmente, para separar la droga en su forma final, se añade ácido clorhídrico y, tras el filtrado y posterior secado, se obtiene la cocaína clorhidrato, de un aspecto nacarado. En ocasiones, a lo largo del proceso se suele usar también carbón activo con la finalidad de eliminar impurezas y obtener una cocaína de mayor calidad y más blanca [23].

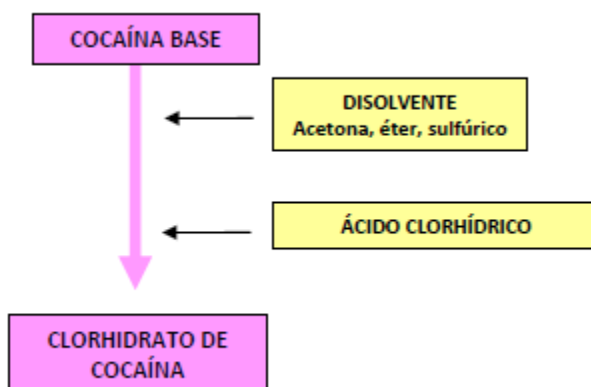


Figura 11. Etapa final del proceso de obtención de clorhidrato de cocaína a partir de la cocaína base. Fuente: referencia [23].

Tras el proceso de obtención del clorhidrato de cocaína en su forma bruta y con una elevada pureza, el siguiente paso es añadirle sustancias diluyentes y adulterantes con el fin de adaptarla al formato de las dosis, pero ésta es una etapa que no se suele realizar en los laboratorios de extracción primaria, sino más cerca de los puntos de distribución. Si bien en España no es frecuente encontrar laboratorios productores de cocaína sí que se han detectado, aunque de forma excepcional, casos de centros en los que se convertía la cocaína base en cocaína clorhidrato. Lo más habitual es que se detecten centros de adulteración [23]. Dicha adulteración se realiza mediante pulverización de la cocaína con el adulterante para conseguir una adecuada homogeneización.

2.3 Formas de presentación de la cocaína

En el caso de la cocaína objeto de tráfico internacional, la presentación en polvo compactado de 1 kg sigue siendo la más común, aunque no es extraño encontrarla impregnada en distintos soportes, disuelta en diferentes disolventes (de tipo acuoso en muchas ocasiones), o mezclada con sustancias que la enmascaren y den lugar a ensayos negativos en los test presuntivos utilizados para su detección.

A continuación se reseñan algunos aspectos significativos de las diferentes formas bajo las que se presenta y manipula la cocaína.

2.3.1 Cocaína en polvo

La cocaína en polvo puede encontrarse a granel, normalmente en forma de polvo de clorhidrato de cocaína compactado en bloques, tabletas o pastillas de 1 kg, o en dosis ya preparadas para su consumo. En el caso de bloques la compactación se realiza con la ayuda de una prensa hidráulica, en una etapa previa al secado final. Durante el proceso suelen estamparse marcas distintivas como figuras, números o letras (ver detalle en la **Figura 12**), a modo de marca comercial. Por lo general esta cocaína se caracteriza por ser de una considerable pureza y su formato está dirigido a facilitar el transporte ilegal de la misma.



Figura 12. Tableta típica de 1 kg de cocaína en polvo y prensa utilizada para su compactación. Fuente: referencia [23].

En cuanto a las dosis, suelen presentarse como envoltorios, normalmente de plástico, con un peso aproximado de medio a un gramo. En estos casos suele tratarse ya de cocaína diluida o mezclada con adulterantes, estando destinada al consumidor final. En la **Figura 13** se muestran ejemplos de dosis de cocaína incautadas por las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad del Estado.



Figura 13. Diferentes formatos de dosis incautadas de cocaína tal como se distribuyen para el consumo. Fuente: Guardia Civil.

2.3.1.1 Cocaína en polvo adulterada

Las tendencias en cuanto al tipo de adulterantes y diluyentes que se utilizan en la preparación de las dosis de cocaína se ha visto que son cambiantes, variando entre países, regiones e incluso épocas [24,25,26].

El levamisol, la cafeína y la lidocaína son considerados hoy en día como los principales adulterantes de la cocaína en Europa[27,28,29,30,31].

A modo de ejemplo se puede indicar que esta Tesis incluye un estudio de 568 dosis de cocaína incautada, del que se ha concluido que los tres adulterantes más comunes de la droga aprehendida en España son el levamisol, la cafeína y la fenacetina, seguido de los anestésicos locales tetracaína, lidocaína y procaína, en el orden indicado. Además, en el caso del levamisol, la fenacetina, la tetracaína y la cafeína existen evidencias de sus efectos tóxicos o potenciadores de la acción de la cocaína.

Actualmente, parece ser que el 70% de toda la cocaína incautada a nivel mundial contiene levamisol[15], especialmente en lo que se refiere a la cocaína a granel; por el contrario, adulterantes como la tetracaína o la cafeína suelen detectarse más habitualmente en las dosis destinadas al consumidor final.

El levamisol es el adulterante más prevalente y parece que ha desplazo el uso de la fenacetina en la cocaína a granel, sustancia con efectos tanto o más tóxicos que el levamisol y que se venía utilizando como principal adulterante hasta hace pocos años [32]. Este adulterante potencia la acción de la cocaína *in vivo* [33] y se ha comprobado que provoca efectos adversos que pueden llegar a ser muy graves, como es el caso de la púrpura retiforme, que se manifiesta como lesiones cutáneas y puede progresara necrosis [34]. Además un consumo inadecuado de levamisol puede producir también neutropenia y vasculopatía [35,36]. Considerando los aspectos anteriormente comentados, el levamisol no

debería considerarse como un simple adulterante, sino más bien como un producto tóxico con capacidad para provocar serias patologías [37].

Por lo que respecta a la cafeína, ésta aumenta y acelera la expresión de la sensibilización inducida por la cocaína [38]. Su consumo en la adolescencia produce cambios neurológicos que se manifiestan en la edad adulta y pueden contribuir al aumento de comportamientos mediados por cocaína [39].

La fenacetina se introdujo en el mercado farmacéutico en 1887 como analgésico y fue retirada en 1983 en Estados Unidos por producir niveles inaceptables de nefritis intersticial en pacientes y por sus riesgos potenciales de generar tumores. La fenacetina es dañina si se inhala o ingiere y puede causar daño renal, hepático y trastornos de la sangre [40]. Está clasificada como Clase 1 (máximo riesgo cancerígeno) según la clasificación estándar de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) [41].

La tetracaína pertenece al grupo de anestésicos locales que se utilizan en clínica para el bloqueo de nervios periféricos, en anestesia epidural y espinal, así como de forma genérica para el manejo del dolor. Su suministro en grandes dosis, la aplicación de forma continuada o tiempos de exposición prolongados, pueden causar neurotoxicidad. Un estudio comparado de diferentes anestésicos locales demostró que su toxicidad en relación a otros anestésicos, según la evaluación de la viabilidad celular y la potencia apoptótica, responde al siguiente orden:

tetracaína>prilocaína>lidocaína >procaína [42].

Respecto a estudios realizados en Europa relativos a las sustancias de corte empleadas en la cocaína, en la **Tabla 3** se pueden ver los resultados correspondientes a un estudio realizado en Dinamarca entre 2002 y 2003 en la que se comprueba que los adulterantes mayoritarios son lidocaína,

fenacetina y cafeína, no apareciendo todavía el levamisol. En un estudio realizado en Holanda para el periodo comprendido entre los años 1999-2007, según los datos presentados en la **Tabla 4**, se observa la misma tendencia que en Dinamarca para los años 2002-2003, además de un aumento progresivo hasta 2007 del porcentaje de muestras adulteradas con fenacetina y también con levamisol, empezándose a detectar este último a partir del año 2004.

Tabla3. Frecuencia de adulterantes detectados en muestras de cocaína durante 2002 y 2003 en Dinamarca. Fuente: referencia [27].

<u>Adulterante</u>	<u>Frecuencia (%)</u>
Lidocaína	65
Fenacetina	42
Cafeína	24
Creatina	22
Procaína	5
Paracetamol	3
Benzocaína	3
Fenazona	1
Efedrina	1
Mirtazapina	1
Ketamina	1

Tabla 4. Tendencia observada en la adulteración de muestras de cocaína en Holanda durante el periodo de 1999 a 2007. Fuente: referencia[28].

<u>Adulterante</u>	<u>1999</u>	<u>2000</u>	<u>2001</u>	<u>2002</u>	<u>2003</u>	<u>2004</u>	<u>2005</u>	<u>2006</u>	<u>2007</u>
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Fenacetina	1.6	1.3	2.1	7.4	16.8	35.6	38.3	48.0	40.6
Lidocaína	3.8	15.0	14.0	8.7	8.3	5.2	4.8	8.2	6.4
Procaína	1.0	5.0	2.8	1.7	3.7	4.8	3.4	12.0	8.3
Benzocaína	-	-	-	-	-	1.0	0.5	0.5	0.2
Cafeína	4.0	2.5	5.6	4.6	3.7	5.5	7.8	10.9	15.8
Hidroxicina	-	-	-	-	-	1.0	0.5	2.0	4.4
Diltiazem	-	-	-	-	-	1.0	2.0	6.6	12.0
Levamisol	-	-	-	-	-	0.6	1.0	4.5	11.6

En la **Tabla 5** se pueden ver los datos correspondientes a un estudio realizado en Luxemburgo, que recoge muestras de los años 2005-2010, en el que también destaca el incremento gradual del número de muestras adulteradas con levamisol, que llegan al 85 % en 2010.

Tabla 5. Principales adulterantes detectados en muestras de cocaína decomisadas en Luxemburgo durante los años 2005 a 2010. Fuente: referencia [30].

Adulterante	2005	2006	2007	2008	2009	2010
	%	%	%	%	%	%
Levamisol	-	18	25	66	76	85
Fenacetina	39	54	76	53	82	55
Hidroxicina	28	23	12	36	23	24
Diltiazem	17	27	52	47	41	23
Benzocaína	6	-	-	-	-	-
Paracetamol	3	4	7	5	-	7
Atropina	3	-	-	-	-	-
Cafeína	-	10	6	20	26	25
Lidocaína	-	4	20	35	36	39
Metilefedrina	-	4	4	-	-	-
Diclofenaco	-	-	5	-	-	-
Procaína	-	2	16	2	4	2
Ibuprofeno	-	-	-	1	-	-
Efedrina	-	-	-	-	-	1

En la **Tabla 6** se indican los resultados obtenidos para un estudio realizado en Francia en el año 2006 que considera el análisis de 343 muestras de cocaína, en el que se observa que la fenacetina es el adulterante mayoritario (en consonancia con la tendencia que se observaba en Holanda y Luxemburgo para ese mismo año), siguiéndole la cafeína y el paracetamol como adulterantes más frecuentes, lo que supone una diferencia con los estudios anteriormente mencionados en los que los porcentajes de aparición del paracetamol son muy bajos o no se detecta. En este estudio se observa también que el 73 % de las muestras presentan al menos un adulterante. Por último, en la **Tabla 7** vemos los resultados correspondientes a un estudio realizado en Finlandia durante los años 2012-2013, que evidencian que el adulterante mayoritario es el levamisol seguido de la cafeína, lidocaína y fenacetina.

Tabla 6. Adulterantes detectados en Francia en muestras incautadas en 2006. Fuente: referencia[29].

<u>Adulterante</u>	<u>Frecuencia de aparición (%)</u>
Fenacetina	54
Cafeína	17
Paracetamol	14
Diltiazem	11
Lidocaína	11
Levamisol	6
Hidroxicina	4
Ácido acetil salicílico	2
Propoxifeno	2
Al menos un adulterante	73

Tabla 7. Adulterantes y diluyentes detectados en muestra de cocaína incautadas en Finlandia durante los años 2012-2013. Fuente: referencia [26].

<u>Adulterante/diluyente</u>	<u>Frecuencia de aparición (%)</u>
Levamisol	33
Cafeína	19
Lidocaína	14
Glucosa	14
Fenacetina	12
Lactosa	12
Manitol	12
Hidroxicina	7
Creatinina	7
Diltiazem	5
Beta-alanina	2
Ibuprofeno	2
Paracetamol	2

En el caso de estudios realizados fuera de Europa cabe mencionar el llevado a cabo por Grobério *et al* en Brasil sobre muestras incautadas durante los años

2009 a 2013 [43]. En este ejemplo los resultados presentados aparecen separados como cocaína base y clorhidrato, ya que en Brasil, a diferencia de los países europeos, la mayor parte de la cocaína incautada está en forma de base. Además incluye el número de adulterantes encontrados en las muestras. Atendiendo a los datos que se presentan en dicho estudio para las muestras de clorhidrato vemos que los adulterantes más comunes son el levamisol, la lidocaína, la fenacetina y la cafeína. En el caso de la cocaína base el adulterante mayoritario es, con diferencia, la fenacetina (**Tabla 8**).

Tabla 8. Adulterantes detectados en muestras de cocaína incautadas en Brasil durante los años 2009 a 2013. Fuente: referencia [43].

<u>Forma</u>	<u>Adulterante</u>	<u>% sobre el total de muestras</u>
Cocaína base	Fenacetina	41.1
	Aminopirina	13.6
	Benzocaína	6.3
	Lidocaína	3.4
	Hidroxicina	3.2
	Cafeína	1.7
	Paracetamol	1.2
	Levamisol	1.0
	Diltiazem	0.3
Cocaína clorhidrato	Levamisol	7.9
	Lidocaína	3.3
	Fenacetina	2.4
	Cafeína	2.4
	Aminopirina	1.8
	Diltiazem	0.7
	Procaína	0.5

En cuanto al número de adulterantes, las muestras de cocaína clorhidrato sin adulterar son las más abundantes, seguidas de las que presentan 1, 2, 3 ó incluso 4 adulterantes (**Tabla 9**).

Tabla 9. Número de adulterantes detectados en muestras de cocaína incautadas en Brasil durante los años 2009 a 2013. Adaptada de la referencia [43].

<u>Forma</u>	<u>Nº adulterantes en la misma muestra</u>	<u>% sobre el total de muestras</u>
Cocaína base	1	44
	0	32
	2	19
	3	4
	4	1
Cocaína clorhidrato	0	49
	1	35
	2	9
	3	6
	4	1

2.3.2 Disoluciones de cocaína

La excelente solubilidad del clorhidrato de cocaína en disolventes acuosos hace que sea frecuente encontrarla en disolución bajo diferentes formatos [44,45,46,47]. Con esta acción, el objetivo que se pretende es el de intentar camuflarla para introducirla a través de las fronteras. A modo de ejemplo, en la **Figura 14** puede verse un alijo incautado de botellas en las que se detectó la presencia de cocaína en forma de disolución azucarada. Sin embargo esta estrategia presenta el inconveniente de que se requiere una etapa posterior en la que la cocaína será extraída en uno de los denominados “laboratorios de extracción secundaria”.



Figura 14. Decomiso de botellas que contienen cocaína disuelta en agua azucarada. Fuente: Guardia Civil.

2.3.3 Cocaína impregnada en tejidos y otros soportes

Otra de las estrategias, que se conoce desde los años 80 [48] y cada vez es más empleada, es impregnar la cocaína en tejidos o diferentes tipos de soporte, como puedan ser papel o cartón con objeto de poder camuflarla [47,49,50,51, 52].

El material que se utiliza más habitualmente para impregnar cocaína es tejido de fieltro en forma de láminas de las utilizadas en manualidades o costura, de dimensiones variables y que se suelen ocultar en fondos de maletas, entre ropa, etc. Otra alternativa consiste en impregnar directamente las prendas de ropa, aunque es menos habitual.

En la **Figura 15** pueden verse dos ejemplos de incautaciones de cocaína en esta presentación. Una de ellas se trata de láminas de fieltro blanco ocultas en el interior de una maleta y la otra es una incautación de tejido negro camuflado en el fondo de cajas de piña. Mediante esta estrategia se pretende camuflar la sustancia entre mercancías o equipaje de manera que pase inadvertida en los controles policiales de puertos y aeropuertos.



Figura 15. Algunos ejemplos de decomisos de cocaína impregnada en tejidos. Fuente: Guardia Civil.

En los soportes impregnados, según la experiencia obtenida de los análisis realizados en el laboratorio a los materiales incautados, la cantidad de cocaína (expresado como base) suele oscilar del 35 al 60 % (p/p).

2.3.4 Cocaína en polvo mezclada con sustancias que interfieren en su detección

En ocasiones la cocaína puede encontrarse mezclada con diferentes sustancias cuyo objetivo principal es el de cambiar su aspecto y/o interferir en su detección. Un típico ejemplo es el de la denominada “cocaína negra”, que es el resultado de mezclar la cocaína en polvo con diferentes sustancias que le confiere un color negro y camufla su olor al tiempo que dificultan su reacción con los reactivos empleados en los test presuntivos que, de forma habitual, se utilizan para la detección e identificación de cocaína. El empleo de esta estrategia de ocultación se conoce desde 1998 [53]. Posteriormente se han detectado iconos religiosos hechos de cocaína negra, cocaína negra en polvo en el interior de cartuchos de tóner o también formando parte de estructuras plásticas [54].

En la **Figura 16** puede verse un ejemplo de una incautación de cocaína en la que se detectó la presencia de cocaína enmascarada por otras sustancias; en concreto se trata de cocaína negra en el interior de paquetes de café y un

bloque de cocaína negra compactada. Como ya se ha indicado, el principal problema de la presencia de estas sustancias es que dificultan la identificación de la cocaína con los test de drogas presuntivos que habitualmente utilizan las unidades aprehensoras; es el caso del test de Scott o test de tiocianato de cobalto. Al producirse falsos negativos y tener la sustancia una apariencia que nada tiene que ver con el habitual polvo blanco, si no se recurre a técnicas más complejas, se puede descartar este tipo de muestras en el *screening* inicial realizado por las fuerzas de seguridad [54].



Figura 16. Diferentes presentaciones de cocaína con objeto de enmascarar la sustancia. Fuente: Guardia Civil, Policía Nacional y Agencia Tributaria.

2.4 Extracción de la cocaína de las diferentes matrices

Una vez la droga ha pasado la frontera, bajo alguna de las formas de camuflaje que han sido descritas previamente, ésta se envía a un laboratorio de extracción secundaria, que son aquellos donde se separa la cocaína de los materiales con los que se ha mezclado con el fin de ocultarla. Para este proceso lo habitual es emplear disolventes, entre los que suelen incluirse hexano, benceno, tolueno, acetato de etilo, alcohol, acetona o amoniaco, entre otros, y operaciones de extracción, filtrado y secado hasta la obtención final de la cocaína clorhidrato [23]. Un esquema simplificado del proceso puede verse en la **Figura 17**.

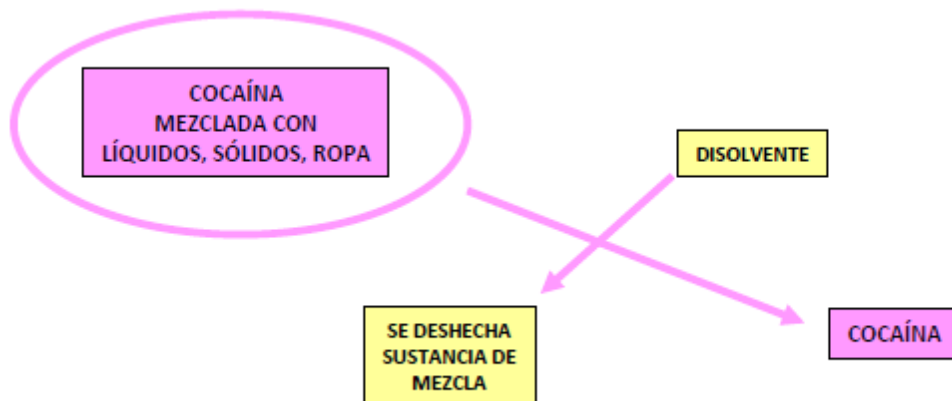


Figura 17. Procesado de la cocaína camuflada en los laboratorios de extracción secundaria. Fuente: referencia [23].

En la **Figura 18** puede verse una incautación procedente de un laboratorio de extracción secundaria donde se extraía cocaína impregnada en tejidos. En ella se aprecian los diferentes disolventes utilizados y también las piezas de tejido impregnado.



Figura 18. Decomiso de un laboratorio de extracción de cocaína impregnada en tejidos. Fuente: Guardia Civil.

2.5 El análisis forense de muestras decomisadas de cocaína

Una vez aprehendidas las muestras sospechosas de contener cocaína por los Cuerpos y Fuerzas de Seguridad, es necesario determinar su composición en laboratorios adecuadamente equipados y mediante técnicas reconocidas. Éste es uno de los objetivos de la denominada Ciencia Forense, que podemos definir como la aplicación de los principios científicos a la resolución de problemas relacionados con la ley. En ese sentido, la Química Forense correspondería a la aplicación de principios y técnicas químicas al campo de la investigación forense [55].

El papel de la Química Forense en las investigaciones penales es muy amplio y abarca desde las técnicas utilizadas para recoger y preservar las pruebas o evidencias incautadas, a complejos procedimientos químicos utilizados para identificar y, en algunos casos cuantificar, elementos y compuestos. Los resultados de una investigación forense van a tener un impacto muy importante en la vida de las personas que han participado en la comisión de un delito, como puede ser la imposición de sanciones o la privación de libertad a través del cumplimiento de una pena de prisión.

Las técnicas utilizadas en la Química Forense deben estar estrechamente reguladas y asegurar la exactitud e integridad de los resultados experimentales [55]. Esto se consigue mediante el empleo de métodos validados y la implantación de un adecuado Sistema de Gestión de la Calidad [21,22,56,57, 58]. Las técnicas analíticas empleadas en los Laboratorios de Control de Drogas están basadas en las Recomendaciones de Naciones Unidas y en las del grupo de trabajo SWGDRUG. [2,21].

Las Recomendaciones de Naciones Unidas establecen una serie de pruebas presuntivas, principalmente ensayos de color, como la prueba de tiocianato de cobalto y una serie de técnicas instrumentales, principalmente basadas en el

empleo de la cromatografía y la espectrometría. Las Recomendaciones del SWGDRUG clasifican las técnicas de análisis en tres categorías en función de la información que se obtiene de ellas, según se indica en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Categorías de técnicas analíticas empleadas para el análisis de materiales incautados. Fuente: referencia [21].

Categoría A	Categoría B	Categoría C
Espectroscopia Infrarroja	Electroforesis capilar	Ensayos de color
Espectrometría de masas	Cromatografía de gases	Espectroscopia de Fluorescencia
Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear	Espectrometría de Movilidad Iónica	Inmunoensayo
Espectroscopia Raman	Cromatografía Líquida	Espectroscopia Ultravioleta
Difractometría de Rayos X	Test Microcristalinos	
	Identificadores farmacéuticos	
	Cromatografía de Capa Fina	
	Examen Macroscópico y Microscópico (para <i>cannabis</i>)	

En cuanto a la elección de las técnicas analíticas en el laboratorio forense, el SWGDRUG establece como criterios mínimos los siguientes [21]:

- En el caso de utilizar una técnica de la categoría A, deberá utilizarse al menos una más de cualquiera de las otras categorías.
- En caso de no utilizar una técnica de la categoría A, se deben emplear tres técnicas diferentes, dos de las cuales deben ser dos técnicas de la categoría B no correlacionadas.

2.6 Pruebas presuntivas de identificación de cocaína

Los métodos de *screening* químico son pruebas presuntivas que normalmente se utilizan para iniciar el proceso de identificación de una sustancia. Estas pruebas no pueden detectar las sustancias con certeza pero proporcionan una confirmación preliminar de la presencia de un determinado grupo funcional o una estructura molecular concreta, mediante la aparición de un color característico cuando la sustancia a identificar está presente en la muestra sospechosa y entra en contacto con ellos. Aunque no son pruebas con gran especificidad van a definir el siguiente paso a seguir en la determinación de la sustancia [55]. Para la identificación de cocaína el test de tiocianato de cobalto es el más empleado: ante la presencia de cocaína el reactivo adquiere una coloración azul característica. Estos test se comercializan en forma de aerosol para poder realizarse de forma más cómoda y rápida fuera del laboratorio (**Figura 19**). Un resultado positivo indica la posible presencia de cocaína, que posteriormente debe confirmarse con alguna de las otras técnicas indicadas.



Figura 19. Test presuntivo de cocaína basado en la reacción con tiocianato de cobalto. Fuente: referencia [59].

Las principales ventajas de las técnicas de color son que, además de ser relativamente baratas, se obtiene el resultado rápidamente y permiten analizar de forma casi simultánea un elevado número de muestras. Los principales inconvenientes son que presenta un importante número de falsos positivos en presencia de ciertas sustancias, la toxicidad de los reactivos que se emplean y la falta de fiabilidad del resultado cuando ha pasado un tiempo desde que se ha producido la reacción [21]. Por ejemplo, la prueba del tiocianato de cobalto presenta falsos positivos para cocaína en presencia de sustancias como la tetracaína o la lidocaína, entre otras. Por otro lado los falsos negativos, esto es, la no identificación de la sustancia cuando realmente sí que se encuentra presente, se producen bien cuando por las características de la matriz resulta complicado realizar esta prueba, como es el caso de cocaína en disolución, o bien por la presencia de alguna otra sustancia que enmascara o inhibe la reacción de identificación.

En resumen, el test del tiocianato de cobalto proporciona una indicación de la posible presencia de cocaína en el material incautado, pero es necesario el empleo de técnicas instrumentales que nos permitan confirmar la presencia de la sustancia buscada o, en su caso, descartarla.

2.7 Técnicas instrumentales empleadas en la determinación de cocaína

Las técnicas instrumentales más utilizadas en los Laboratorios de Control de Drogas son la cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la espectroscopia infrarroja (IR).

Como se indicó, la espectrometría de masas y la espectroscopia infrarroja están incluidas en el grupo de las técnicas de clase A, según establece la clasificación de la SWGDRUG. Ambas técnicas resultan muy útiles ya que proporcionan información acerca de la estructura de la molécula, especialmente cuando se trate de sustancias con una cierta pureza. Por su parte, la cromatografía de gases está incluida como técnica de clase B, resultando de gran utilidad para llevar a cabo la separación de la sustancia a identificar en presencia de otras o su análisis en matrices complejas.

A continuación se describen las técnicas instrumentales empleadas en esta Tesis Doctoral.

2.7.1 Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)

La cromatografía de gases (GC) es la técnica cromatográfica más utilizada en los laboratorios forenses modernos [55], siendo el cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) provisto de una columna capilar, con diámetro interno de entre 0.20 μm y 0.32 μm , el instrumento preferido en los laboratorios de estupefacientes para analizar muestras de rutina [2]. En la **Figura 20** se puede ver un esquema simplificado de su funcionamiento. Los cromatógrafos de gases actuales son equipos muy robustos que proporcionan niveles elevados de reproducibilidad, exactitud y precisión. Además, el empleo

de inyectores automáticos permite procesar de forma sencilla un elevado número de muestras.

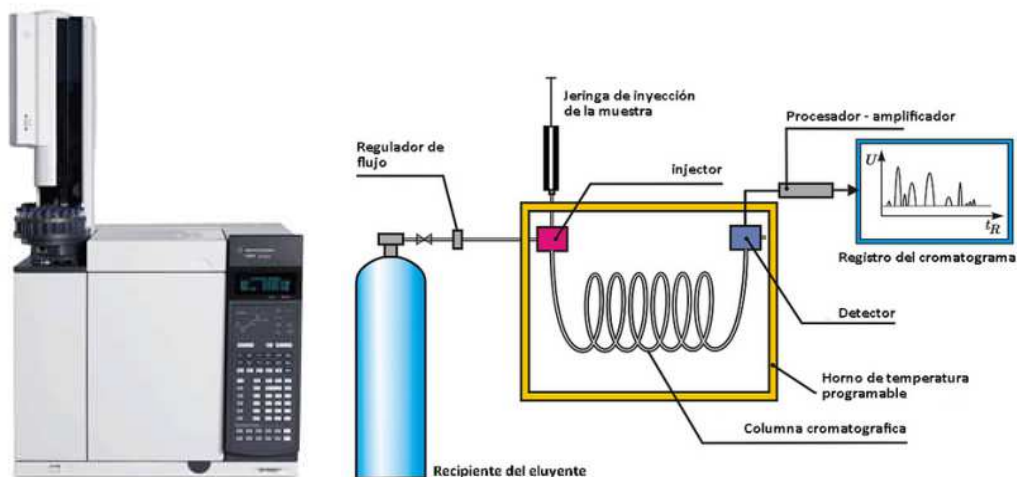


Figura 20. Cromatógrafo de gases con detector FID Agilent y representación esquemática de sus componentes. Fuente: referencias[60,61].

Mediante la técnica GC-FID la muestra vaporizada se separa en sus diferentes componentes y llega al detector de ionización de llama donde los diferentes compuestos de la muestra se ionizan. Los iones procedentes de la separación de los distintos componentes generan una corriente eléctrica que se mide y se traduce en una señal que corresponde con el cromatograma en el que aparecen los diferentes picos de las sustancias. A modo de ejemplo, en la **Figura 21** se puede ver un cromatograma de dos compuestos donde aparecen señalados los tiempos de retención (t_R) para cada uno de ellos.

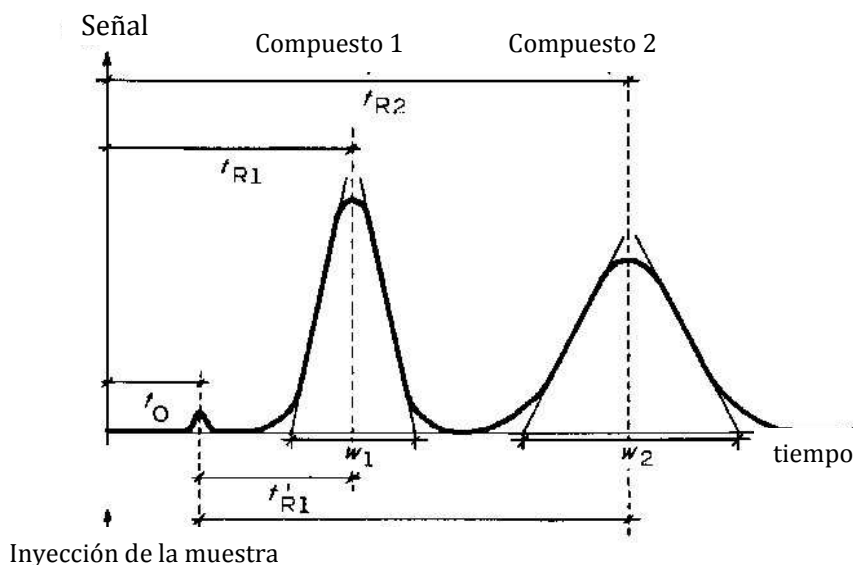


Figura 21. Representación de un cromatograma para dos compuestos. Fuente: referencia [62].

Los tiempos de retención nos servirán para identificar cada uno de los compuestos separados, mientras que las áreas bajo el pico se relacionan con las concentraciones de los analitos y permiten construir una curva de calibrado. Habitualmente se suele inyectar junto con la muestra un patrón interno para corregir errores instrumentales. Para la identificación del compuesto suele usarse el tiempo de retención relativo, que es el tiempo de retención del analito respecto al del patrón interno. Para realizar la calibración relacionaremos el área de analito respecto de la del patrón interno.

Como principales inconvenientes de esta técnica destaca la necesidad de un tratamiento previo de la muestra que supone la destrucción de la misma, la generación de residuos y la necesidad de manipular disolventes por parte del operador, además del tiempo de análisis que se requiere para la obtención de los cromatogramas.

2.7.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas es una de las técnicas más utilizadas para la identificación de muestras de drogas con fines forenses. Como técnica combinada aúna el poder de discriminación y la sensibilidad de la cromatografía de gases con la especificidad para los analitos analizados que aporta la técnica de espectrometría de masas [2].

Los diferentes componentes de la muestra vaporizada eluyen a sus respectivos tiempos de retención a través de la columna cromatográfica y se analizan de forma independiente en el espectrómetro de masas, que está conectado en línea al cromatógrafo de gases. En la cámara de ionización las moléculas se ionizan y se fragmentan, de aquí pasan al analizador de masas, que separa los iones en función de su relación masa/carga y los dirige al detector. En la **Figura 22** puede verse un esquema simplificado de su funcionamiento. Los analizadores de masas más utilizados son el de sector magnético, trampa de iones y el de cuadrupolo [55]. Este último es el más común en los laboratorios de análisis debido a su facilidad de uso, pequeño tamaño y menor coste.

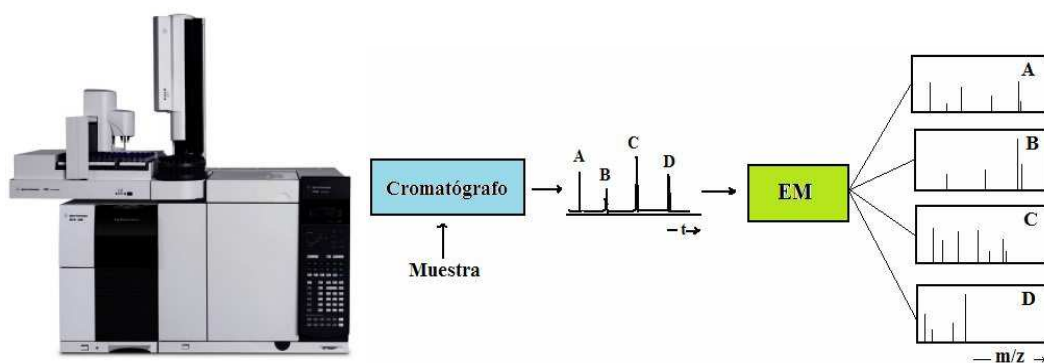


Figura 22. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas Agilent y representación esquemática de su funcionamiento. Fuente: referencias [60,63].

En la **Figura 23** se puede ver un espectro de masas típico, en el que se han destacado los picos que habitualmente se utilizan para realizar la identificación de los analitos. De todos ellos, los más significativos son el pico base y el ión molecular. El pico base es el más abundante, dado que corresponde con el fragmento que se forma con más facilidad y, por tanto, resulta ser el más estable, aunque no es específico de una molécula concreta. Es habitual que moléculas de una misma familia compartan un mismo pico base. Por su parte, el ión molecular es el que se produce cuando la molécula pierde un electrón en el proceso de ionización. Este ión suele ser bastante inestable, razón por la que no siempre alcanza el detector y, por tanto, no aparece en el registro del espectro de masas de algunas moléculas. En caso de que aparezca proporciona información muy valiosa acerca del peso molecular del compuesto de interés, lo que resulta de gran ayuda para su posible identificación y confirmación [55]. A modo de ejemplo, en la **Figura 24** se muestra el espectro de masas de la cocaína en el que aparecen señalados su pico base y el ión molecular. Además de estos dos picos, en los espectros aparecen otras señales asociadas a diferentes tipos de fragmentos que facilitan la identificación de las sustancias. Esta es la razón por la que, asociado a cada compuesto, su espectro de masas tiene unas señales que corresponden a fragmentos característicos y permite una identificación de la molécula objetivo. En la **Tabla 11** pueden verse los datos correspondientes al pico base, ión molecular y las señales de los fragmentos de masas característicos para algunas de las drogas de abuso más habituales.

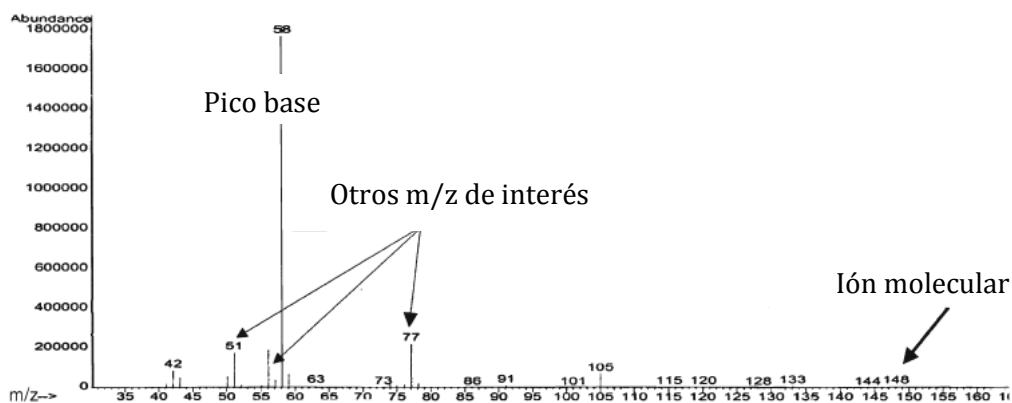


Figura 23. Ejemplo de un espectro de masas típico donde se señalan los principales picos para la identificación. Fuente: referencia[55].

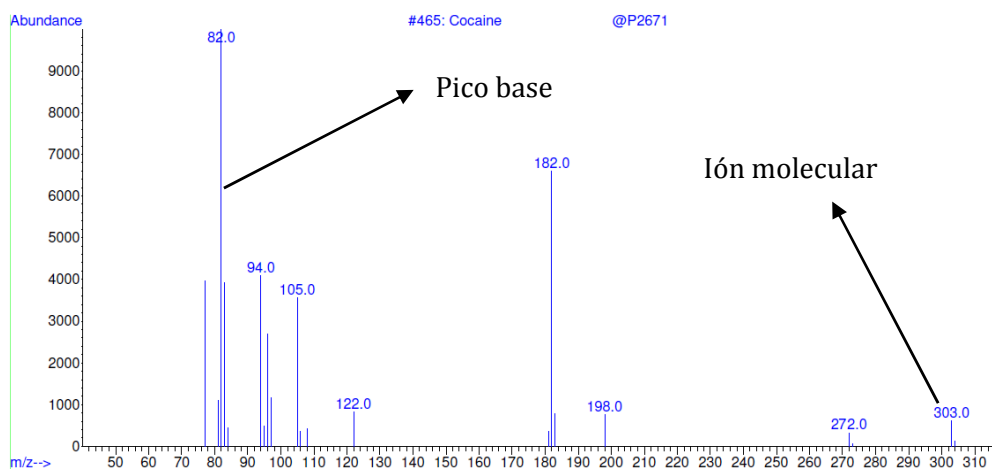


Figura 24. Espectro de masas característico de la cocaína. Fuente: Biblioteca *Wiley Library*.

Tabla 11. Valores de la relación masa/carga característicos de los espectros de masas de algunas de las drogas más comunes. Fuente: referencia [55].

<u>Nombre de la sustancia</u>	<u>Masa molecular</u>	<u>Pico base</u>	<u>m/z más abundantes</u>				
Anfetamina	135	44	65	77	91	92	120
Butabarbital	212	141	41	98	155	156	157
Butalbital	224	168	97	124	141	153	167
Cannabinol	310	295	165	223	238	295	296
Tetrahidrocannabinol (THC)	314	231	91	174	243	258	271
Catinona	149	44	50	51	77	78	105
Cocaína	303	82	77	83	94	105	
Codeína	299	299	42	124	162	214	229
Diazepam	284	256	77	151	165	221	
Efedrina/Pseudoefedrina	165	58	51	56	77	79	105
Fentanilo	336	245	77	91	105	146	189
GHB/GBL	86	42	41	56	85	55	45
Heroína	369	327	43	204	215	268	310
Hidrocodona	299	299	96	115	185	214	228
Ketamina	237	180	102	115	138	152	182
LSD	323	221	72	167	181	196	207
MDA	179	44	51	81	77	135	136
MDMA	193	59	51	89	105	135	
Mescalina	211	182	136	148	151	167	
Metadona	309	72	57	91	115	165	178
Metanfetamina	149	58	56	65	91	115	119
PCP	281	200	85	91	104	117	129
Psilocina/Psilocibina	204	58	42	77	117	146	159

Nota: GHB: Ácido gamma-hidroxibutírico; GBL: gamma-hidroxybutirolactona. LSD: dietilamida de ácido lisérgico; MDA: 3,4-Metilendioxianfetamina, MDMA: 3,4-Metilendioximetanfetamina; PCP: Fenciclidina.

En el lado negativo, esta técnica presenta los mismos inconvenientes que los indicados para la GC-FID, a los que hay que añadir el mayor coste de los equipos, lo que hace que el uso de GC-MS no esté instaurado de forma generalizada en todos los laboratorios dedicados al análisis de estupefacientes.

2.7.3 Espectroscopia IR

La espectroscopia es el estudio de la interacción de la materia con la radiación electromagnética. El espectro electromagnético se divide en regiones en función de su longitud de onda y, por tanto, de su energía. La región infrarroja es adyacente a la región visible del espectro electromagnético y contiene los intervalos de frecuencia entre 13000 y 30 cm^{-1} (ver **Figura 25**). A su vez, esta región se divide en el infrarrojo cercano o NIR de 1300 a 4000 cm^{-1} , el infrarrojo medio o MIR (de 4000 a 400 cm^{-1}) y el infrarrojo lejano o FIR (desde 400 hasta aproximadamente 33 cm^{-1}).

La identificación de compuestos mediante espectroscopia infrarroja se basa en la capacidad de las moléculas para absorber la radiación en esta región. Cuando una radiación incide en una muestra, puede sufrir diferentes fenómenos, como son absorción, transmisión y reflexión. La intensidad de la radiación transmitida a través de la muestra es menor que la intensidad incidente: una parte de ella se ha reflejado, mientras que otra ha sido absorbida por la sustancia [64]. Los átomos en la molécula están en continua vibración unos respecto a otros a través de los correspondientes enlaces, de modo que una molécula absorberá la radiación infrarroja cuando la frecuencia de una vibración específica sea igual a la frecuencia de la radiación infrarroja dirigida hacia ella. Además, para que se produzca, esta absorción de radiación debe dar lugar a un cambio en el momento dipolar de la molécula.

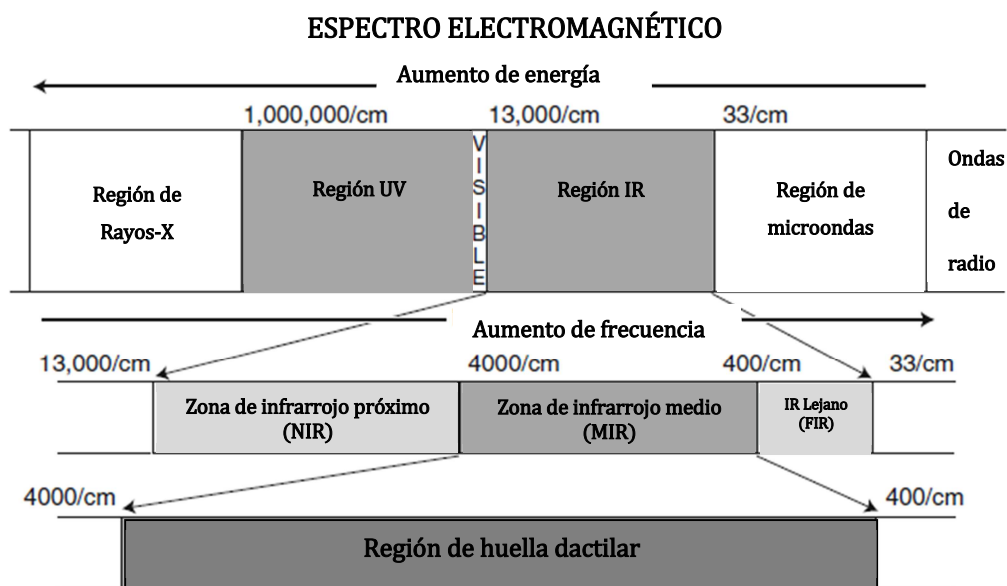


Figura 25. Espectro electromagnético. Fuente: adaptado de la referencia[52].

La región más usada habitualmente para la identificación forense de sustancias es el IR medio (4000 a 400 cm^{-1}). La parte comprendida entre 2000 y 400 cm^{-1} se conoce comúnmente como región de huella dactilar. El espectro infrarrojo es una medida de la cantidad de radiación infrarroja que es absorbida por la muestra, en el que las frecuencias de absorción se mostrarán como bandas características en el espectro [52].

Existen dos tipos básicos de instrumentos para la obtención de los espectros IR: los dispersivos y los de transformada de Fourier (FT-IR). Los espectrómetros FT-IR han desplazado en los últimos años el uso de los dispersivos debido a su mayor rapidez y sensibilidad [65].

El diseño básico de un espectrómetro de transformada de Fourier se basa en el interferómetro de Michelson, que comprende un espejo fijo, un espejo móvil y un divisor de haz, con una fuente y un detector adecuados [65].

La fuente más común en un espectrómetro en el IR medio es la Global, que consiste en una varilla de carburo de silicio sinterizado (tratamiento térmico para aumentar la resistencia mecánica) que se calienta eléctricamente a unos 1400 K y emite radiación continua que se aproxima a la de un cuerpo negro. Dicha radiación abarca un margen amplio de longitudes de onda, que incluyen las regiones de IR cercano y lejano. Por su parte, la fuente más común para el infrarrojo cercano es la lámpara halógena de cuarzo-tungsteno. El arco de mercurio a alta presión es la fuente más usada en el IR lejano [65].

En cuanto a los detectores, podemos diferenciarlos en dos tipos: térmicos y fotoconductores. En el infrarrojo medio (MIR) los detectores térmicos clásicos son los piroeléctricos, que trabajan a temperatura ambiente, como el de sulfato de triglicinadeuterada (DTGS), sulfato de triglicina deuterada dopado con L-alanina (DLaTGS) y también el de tantalato de litio (LiTiO_3), que es relativamente barato pero de menor sensibilidad. En cuanto a los de tipo fotoconductor el más utilizado es el detector de telurio de cadmio y mercurio (MCT) refrigerado con nitrógeno líquido y que proporciona una velocidad de adquisición y una sensibilidad mucho mayor que los de los detectores térmicos. En el infrarrojo cercano (NIR) los detectores comúnmente empleados son los fotoconductores de sulfuro de plomo (PbS) y los de arseniuro de galio e indio (InGaAs) [65].

El potencial y la versatilidad de los métodos analíticos basados en espectroscopia vibracional, se fundamenta en los siguientes aspectos:[65,66]

- Eliminar los riesgos químicos asociados a la preparación de las muestras.
- Reemplazar los sistemas de medida necesarios para cada uno de los componentes a analizar por un único instrumento.

- La reducción del coste de los análisis.
- Proporcionar características analíticas similares a los métodos de referencia utilizados pero sin efectos negativos sobre el medio ambiente y de una manera segura para los operadores.
- Su capacidad para obtener espectros de forma rápida y realizar una identificación que no requiere la destrucción de la muestra.
- La selectividad y especificidad que proporciona el infrarrojo medio.
- La disponibilidad de equipos de medida portátiles.
- La facilidad para obtener nuevas bibliotecas de espectros.
- Su capacidad para ser utilizado como método de *screening* a un bajo coste.

En cuanto a los diferentes modos de medida en el infrarrojo, en esta Tesis Doctoral se han realizado medidas por reflexión total atenuada en el infrarrojo medio (ATR-MIR) y por reflexión difusa en el infrarrojo cercano (DR-NIR), por lo que en los apartados siguientes se va a dedicar una especial atención a la descripción de estas técnicas.

2.7.3.1 Espectroscopia ATR-MIR

La espectroscopia de reflexión total atenuada (ATR) se fundamenta en el fenómeno de reflexión total interna. Un haz de radiación que penetra en un cristal que está en contacto con una muestra experimentará reflexión total interna cuando el ángulo de incidencia en la interfaz entre la superficie de la muestra y el cristal sea mayor al ángulo crítico. Éste va a depender de los índices de refracción de ambas superficies, y la reflexión será más efectiva cuanto mayor sea la diferencia en los valores de ambos índices (**Figura26**).

El haz de una determinada longitud de onda penetra más allá de una superficie reflectante formándose la denominada onda evanescente (**Figura 27**). Cuando un determinado material, que absorbe selectivamente la radiación, está en estrecho contacto con dicha superficie reflectante el haz pierde energía a la longitud de onda a la cual absorbe el material. La radiación atenuada resultante se mide y se representa como función de la longitud de onda y da lugar al espectro de absorción característico de la muestra [67].

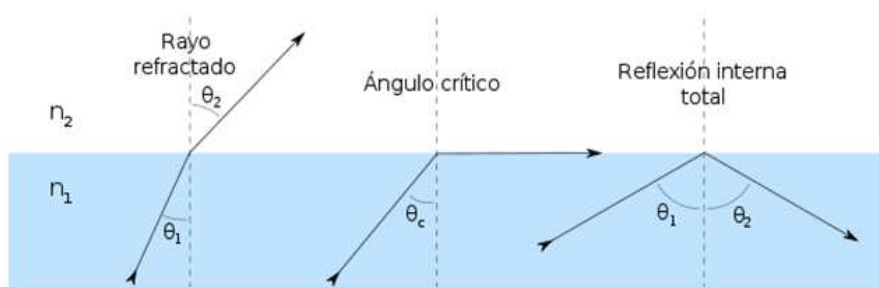


Figura 26. Fenómeno de reflexión total interna. Fuente: referencia [68].

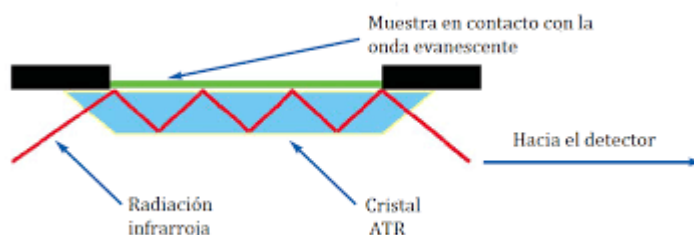


Figura 27. Esquema de un accesorio ATR. Fuente: adaptado de la referencia [69].

Los espectros de ATR son similares a los obtenidos por medidas de transmisión, presentando las mismas bandas pero con intensidades relativas diferentes. Ello es debido a que el grado de penetración de la radiación en la muestra depende no sólo del ángulo de incidencia y de los índices de refracción, sino también de la longitud de onda de la radiación.

La gran ventaja que presentan las medidas ATR es la facilidad para la obtención de los espectros, ya que únicamente se requiere que la muestra entre en contacto con el cristal ATR. En el caso de muestras líquidas basta con depositar una pequeña cantidad sobre la superficie del cristal, mientras que para las muestras sólidas es necesario ejercer una presión sobre la muestra para que se produzca un buen contacto con el cristal ATR. Todo esto permite que puedan obtenerse los espectros ATR de prácticamente todo tipo de muestras, incluso de aquellas que no resulten transparentes a la radiación infrarroja o presenten una fuerte absorción. Desde el punto de vista de la química forense, las ventajas que ofrece las actuales medidas por reflexión total atenuada son que la muestra no se destruye, de manera que puede recuperarse para pruebas adicionales, que se trata de una técnica que proporciona mucha información y que nos permite diferenciar con relativa facilidad entre compuestos diastereoisómeros como la efedrina/pseudo efedrina y entre las formas base libre/sal de las diferentes drogas [22].

Las drogas de abuso son moléculas complejas que presentan espectros IR característicos en la región de “huella dactilar”. Hay que tener en cuenta que debido a las similitudes estructurales de algunas de estas moléculas, pueden presentar espectros de vibración bastante similares. La presencia de sustancias de corte o la baja concentración de las sustancias activas también puede complicar la interpretación de los espectros por estos problemas pueden solucionarse con el tratamiento matemático de los espectros (por ejemplo, la derivada) o con la ayuda de métodos de análisis multivariante [65].

La espectroscopia ATR FT-IR es ya una técnica que se utiliza de forma rutinaria. Existen disponibles tanto equipos de sobremesa, como portátiles y de mano. Estos equipos no requieren que se realice un tratamiento previo de la muestra, como ocurre con las medidas de transmisión empleando pastillas de KBr [65].

Los principales problemas que presenta la espectroscopia IR es la interferencia espectral de las sustancias diluyentes y adulterantes (en general, debido a la matriz de las muestras) y la falta de una fácil automatización, en comparación con otras técnicas como pueda ser la cromatografía.

El uso de la espectroscopia infrarroja unida a técnicas quimiométricas para el tratamiento de los espectros podría suponer una alternativa sostenible a los actuales métodos de análisis en los laboratorios de química forense basados en el empleo de la cromatografía [66,70].

2.7.3.2 Espectroscopia DR-NIR

Cuando un haz de radiación incide sobre una muestra opaca y no absorbente se produce el fenómeno de reflexión especular, que está regido por las ecuaciones de Fresnel. Cuando la superficie es irregular, se puede considerar una interfase formada por pequeñas superficies orientadas hacia todos los ángulos posibles. Cada pequeña interfase refleja la luz según la ley de Fresnel, de modo que el efecto global es una reflexión de la luz hacia todas las direcciones, que es lo que se conoce como reflexión difusa (**Figura 28**). Este efecto de reflectancia depende de la composición de la muestra.

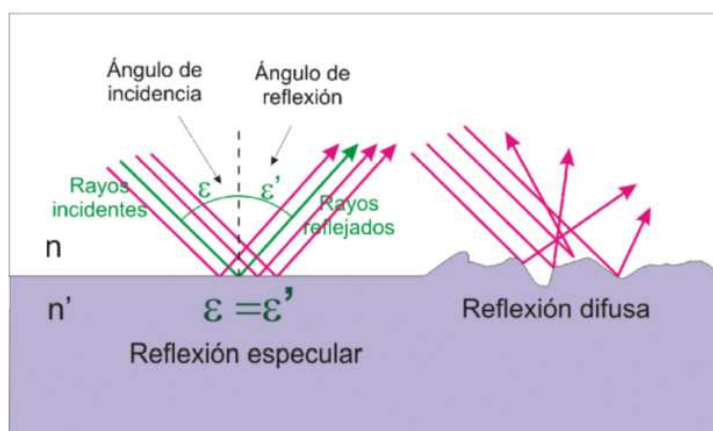


Figura 28. Fenómeno de reflexión especular y reflexión difusa. Fuente: referencia [71].

La relación de la reflexión difusa con la composición de la muestra se explica por la teoría de Kubelka-Munk, que relaciona la concentración de los analitos en las muestras con la intensidad de la radiación dispersada según la expresión [67]:

$$\frac{(1-R)^2}{2R} = \frac{c}{k} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde R es la reflectancia absoluta, c es la concentración y k el coeficiente de absorción molar.

Mientras que la asignación de las bandas en el MIR, en la mayoría de los casos, va a servir para obtener información acerca de la estructura molecular presente, los enlaces químicos, etc, en la espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIR) los espectros observados se suelen utilizar sobre todo con fines cuantitativos empleando procedimientos quimiométricos puesto que las bandas NIR corresponden a sobretonos y son menos finas y características que las del MIR [72].

En espectroscopia NIR las medidas por reflexión difusa de muestras sólidas es la técnica de medida más habitual. Para ello se utiliza una esfera integradora, que es un elemento óptico provisto de una esfera hueca cuya pared interna posee un recubrimiento altamente reflectante. Dicha esfera permite medir la intensidad de la radiación NIR dispersada desde la superficie de las muestras sin que se vea afectada por las diferencias en cuanto a la dirección de la dispersión (la propia reflexión difusa). Esta técnica se puede aplicar a la mayoría de muestras excepto a aquellas con superficies lisas donde únicamente se produzca reflexión especular. El uso de la esfera integradora permite obtener medidas de una manera rápida en el infrarrojo cercano sin destrucción de la muestra y sin necesidad de un tratamiento previo de la misma [72].

En cuanto al uso de sondas de fibra óptica para realizar las medidas por DR-NIR, existen diferentes tipos que pueden utilizarse para irradiar y condensar la radiación NIR. Estas sondas poseen la ventaja de que se pueden utilizar para realizar medidas *in situ* de gran variedad de materiales y muestras, en diferentes condiciones [72], lo que les dota de gran utilidad para el análisis forense.

En esta Tesis Doctoral se utilizó una sonda de fibra óptica que incluye al final de la misma un puerto de irradiación y uno colector de la radiación difusa generada por la muestra. Esta sonda ha permitido realizar un mapeo de alguna de las muestras en diferentes partes de la misma y poder observar si existen diferencias de homogeneidad en cuanto a su composición.

2.8 Tratamiento matemático de los espectros IR a través del empleo de la quimiometría

La Quimiometría es una disciplina metrológica que aplica conocimientos matemáticos, especialmente estadísticos, a procesos químicos para extraer de los datos experimentales la mayor cantidad posible de información y ampliar el conocimiento del sistema químico [73].

La estadística univariante describe el vector de resultados correspondientes a una única variable experimental mediante una serie de características relativas a una muestra y realiza inferencias sobre la información obtenida bajo unas determinadas condiciones experimentales. El análisis multivariante implica una estructura más compleja, con una disposición matricial de los datos. Cumple también con los objetivos descriptivo e inductivo pero trabajando simultáneamente con varias variables, de modo que la información que se maneja es multidimensional. Las variables que se emplean son de naturaleza similar y es preciso seccionarlas para identificar aquellas que tienen una importancia superior a las restantes[73].

A continuación se describen los métodos de análisis multivariante que se han empleado en esta Tesis Doctoral.

2.8.1 Métodos de clasificación y reconocimiento de pautas

Los métodos de reconocimiento de pautas son un conjunto de herramientas encaminadas a extraer la mayor cantidad posible de información de los datos experimentales obtenidos para un conjunto de muestras con el objetivo de dividir los elementos del conjunto (espectros en este caso) en clases, de modo que todos los elementos agrupados en una misma clase se caractericen por una o varias propiedades que les sean comunes [73].

El espectro IR de una muestra puede contener gran cantidad de información sobre las características de la misma, de modo que un estudio adecuado del mismo puede constituir una valiosa herramienta en los laboratorios analíticos. En este sentido, la combinación de la espectroscopia infrarroja con los métodos de clasificación y reconocimiento de pautas tiene múltiples aplicaciones en el campo de las ciencias forenses. Ejemplos de aplicaciones en Química Forense pueden ser la identificación y clasificación de sustancias ilegales, como en el caso de la cocaína [74,75], así como la detección de medicamentos falsificados [76].

Las técnicas quimiométricas de clasificación que habitualmente se aplican cuando se quieren establecer perfiles de drogas incluyen el análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis*, PCA), el análisis de conglomerados (*Hierarchical Cluster Analysis*, HCA), el análisis discriminante lineal (*Lineal Discriminant Analysis*, LDA) o el análisis empleando redes neuronales artificiales (*Artificial Neural Network Analysis*, ANNA)[77].

En los estudios incluidos en esta Tesis Doctoral se ha recurrido básicamente al empleo del análisis de componentes principales y del análisis *clusters* (HCA). Ambos son ejemplos de métodos de reconocimiento de pautas no supervisados, en los que no es necesario disponer de información previa acerca de las muestras [74]. Se trata por tanto de métodos exploratorios de análisis de datos a partir de los cuales se pueden identificar grupos naturales en los conjuntos de datos que, en nuestro caso, constituyen los espectros IR.

2.8.1.1 Análisis de componentes principales (PCA)

El PCA trata de definir a partir de un conjunto inicial de variables (observables), otro conjunto de variables (no observables), obtenido por combinación de las variables originales pero que no aparecen correlacionadas entre sí, siendo posible extraer de ellas una información discriminada de

algunas características del sistema en estudio [73]. Es, por lo tanto, un método de reducción de variables que permite representar en un espacio de un número reducido de dimensiones observaciones que corresponde con un espacio general p -dimensional.

Consideramos un conjunto de datos centrados (corregidos respecto a la media) y suponemos que se representan en un nuevo espacio bidimensional para lo cual se proyectan los puntos experimentales sobre los nuevos ejes. En la **Figura 29** se puede apreciar una proyección de los datos para un eje X^* girado 10° y para un eje X^{**} girado 60° . Se observa que las proyecciones de los puntos experimentales sobre el eje X^* están más agrupadas (su varianza es menor) que las proyecciones sobre el eje X^{**} , cuya varianza es mayor. Esto demuestra que X^{**} representa una variable con mayor contenido informativo que X^* .

Calcular las coordenadas de cada punto experimental (x,y) en el nuevo sistema de ejes (x^*, y^*) es inmediato si se conoce el ángulo girado θ .

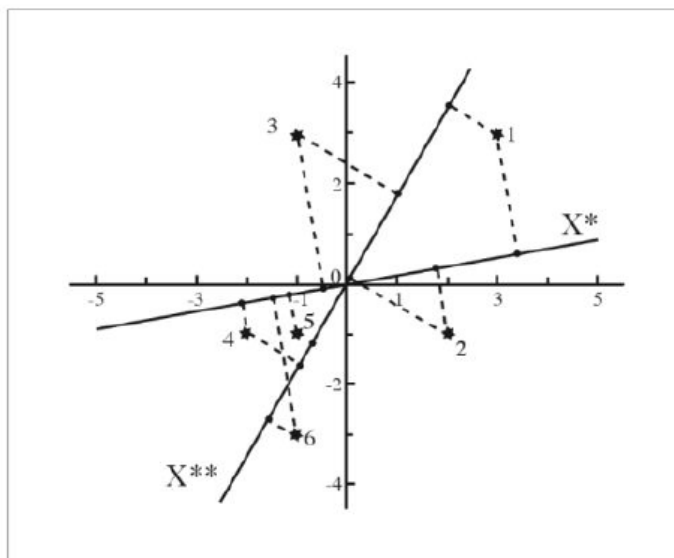


Figura 29. Rotación ortogonal de ejes en el espacio R^2 . Fuente: referencia [73].

Mediante el procedimiento anterior se puede girar el eje de abscisas hasta encontrar la dirección sobre la cual las trazas de los datos experimentales retengan la varianza explicada del conjunto inicial máxima. Las coordenadas en el nuevo sistema de ejes son una combinación lineal de las coordenadas sobre los ejes originales. Al representar las varianzas de X^*_1 frente al ángulo girado θ resulta una curva (**Figura 30**) que pasa por un máximo, que es el punto de la varianza máxima. Esta nueva variable no contiene toda la varianza de los datos pero es posible identificar un segundo eje X^*_2 al que corresponda el resto de la varianza no contemplada en X^*_1 . Este segundo eje X^*_2 es ortogonal al primero. Todo ello siempre y cuando las variables iniciales se puedan reducir a dos componentes principales.

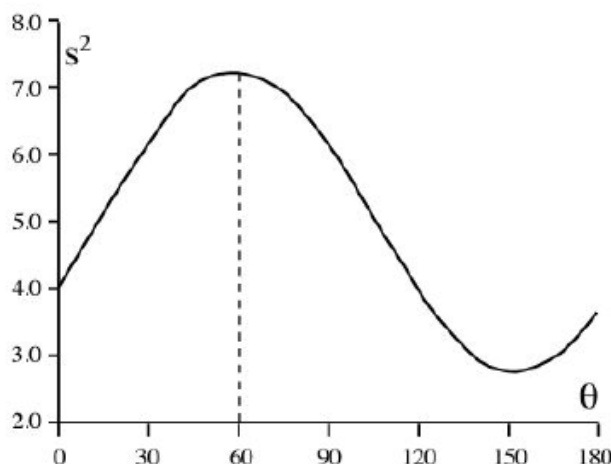


Figura 30. Variación de la varianza en la rotación. Fuente: referencia [73].

La covarianza también varía al girar los ejes y es nula para las variables correspondientes al máximo y al mínimo de la varianza. Esto demuestra que una rotación para la varianza máxima lleva a unas variables X^*_1 y X^*_2 no correlacionadas. La distribución de los puntos experimentales en el espacio (bidimensional en este caso) no se altera en una rotación ortogonal por lo que la representación puede efectuarse indistintamente frente a los nuevos ejes o los originales. Las proyecciones de los puntos sobre los ejes iniciales son los valores originales de las variables y las proyecciones sobre los nuevos ejes son los nuevos valores de las variables (*scores*). A los nuevos ejes se les llama componentes principales y los *scores* corresponden a la traza sobre las componentes principales [73]. La técnica permite transformar las variables originales correlacionadas en nuevas variables no correlacionadas, facilitando la interpretación de los datos originales[78].

En resumen, el PCA está basado en la descomposición de una matriz de datos X en una matriz de cargas o *loadings* y en una matriz de puntuaciones o *scores*.

Se denominan cargas factoriales o *loadings* a los cosenos directores entre las variables originales y las nuevas variables y tienen una gran importancia en la interpretación de los componentes principales. Los *loadings* estiman el grado de influencia que las variables originales ejercen en la formación de los componentes principales y, por lo tanto, presentan una forma parecida a la de los espectros.

La representación gráfica de los *scores* de los PCs permite detectar pautas en las muestras. Un ejemplo lo podemos ver en la **Figura 31** que indica la representación de los *scores* para un modelo PCA basado en espectros NIR de muestras de diferentes lotes de fabricación de un mismo medicamento y en el que se aprecian los diferentes grupos formados para cada uno de los lotes de fabricación [79].

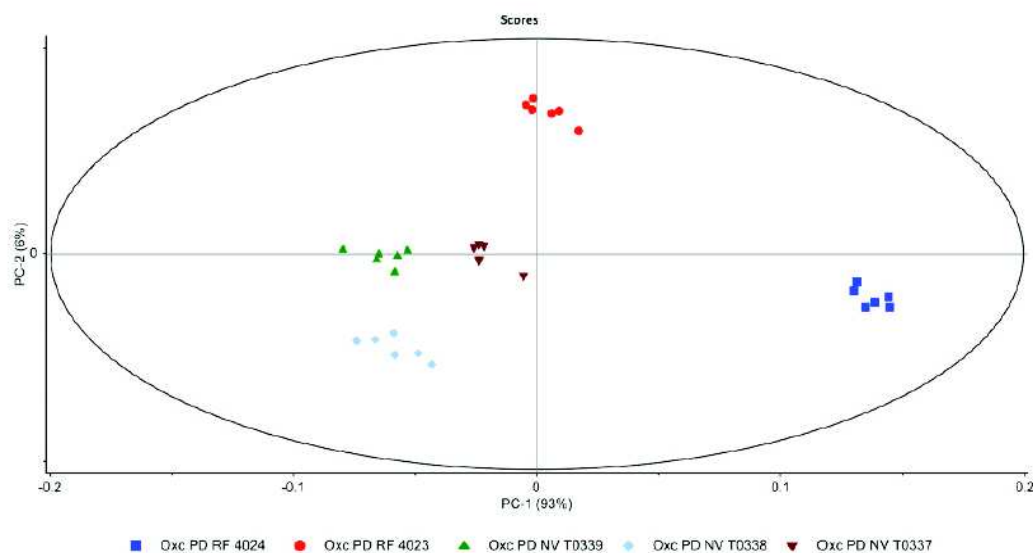


Figura 31. Representación gráfica de los *scores* para un modelo PCA basado en espectros NIR de muestras de cinco lotes diferentes de un mismo medicamento. Fuente: referencia [79].

2.8.1.2 Análisis *cluster* de conglomerados (HCA)

El análisis *cluster* es un método que permite dividir un grupo o conjunto de objetos en una serie de clases, de manera que los objetos que presentan características similares se encuentren agrupados en una misma clase. Se trata de una técnica de reconocimiento de pautas no supervisada en la que los grupos de muestras similares no se suelen conocer antes de realizar el análisis matemático y no se realiza ningún supuesto sobre la distribución de las variables.

El análisis *cluster* busca objetos que se encuentren próximos en el espacio de las variables [80]. La distancia (d_E) que existe entre dos puntos de un espacio n -dimensional con coordenadas (p_1, p_2, \dots, p_n) y (q_1, q_2, \dots, q_n) se calcula habitualmente a través de la distancia Euclídea, definida por:

$$d_E(P, Q) = \sqrt{(p_1 - q_1)^2 + (p_2 - q_2)^2 + \dots + (p_n - q_n)^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (p_i - q_i)^2} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Una vez seleccionado el tratamiento previo del espectro, hay una serie de métodos para la formación de los conglomerados a partir de las variables originales. Uno de ellos es el algoritmo de Ward, creado originariamente por Joe H. Ward Jr. [81]. Dicho método, a diferencia de otros, no calcula distancias entre conglomerados sino que intenta minimizar la varianza dentro de ellos. Con este fin se computa como medida de disimilitud la suma total de cuadrados de las distancias (SC_{dentro}) dentro de los conglomerados desde cada objeto del conglomerado hasta su centroide y en cada etapa se forma el conglomerado que tenga la menor SC_{dentro} . La representación de las sucesivas etapas de agrupación de las muestras en grupos constituye el denominado dendrograma (**Figura 32**).

El método de Ward es uno de los más utilizados en la práctica. Investigaciones llevadas a cabo por Kuiper y Fisher, Blashfield, Hans y Everitt, y Ferreira y

Hitchcock han probado que este método, en general, es capaz de acertar mejor con la clasificación óptima que otros métodos como el algoritmo de enlace promedio, el de enlace completo o el algoritmo de enlace simple[82].

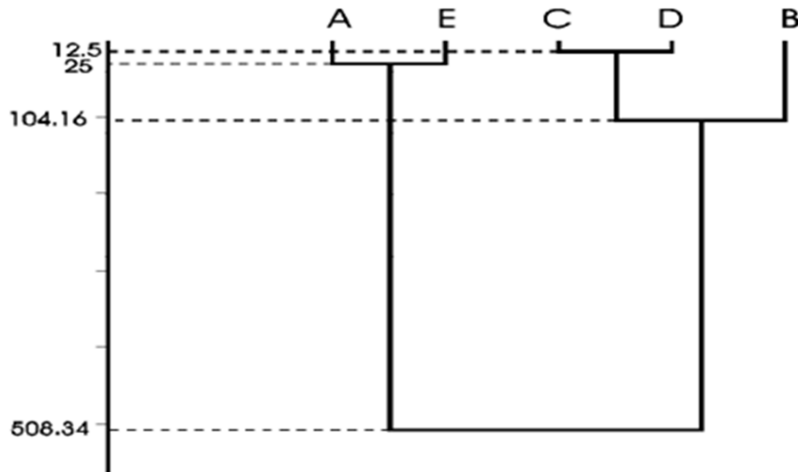


Figura 32. Ejemplo de dendrograma realizado con el método de Ward. Fuente: referencia [83].

2.8.2 Técnicas de regresión multivariante

El desarrollo de la tecnología en el campo computacional y de la espectroscopia ha permitido la expansión de métodos de cuantificación mediante espectroscopia infrarroja. Los métodos de regresión multivariante más comúnmente empleados en espectroscopia IR son los siguientes: mínimos cuadrados clásicos (*Classical Least Squares, CLS*), mínimos cuadrados inversos (*Inversal Least Squares, ILS*), mínimos cuadrados parciales (*Partial Least Squares, PLS*) y regresión sobre componentes principales (*Principal Component Regression, PCR*) [67]. Actualmente, la regresión PLS es una de las más utilizadas para la cuantificación de diferentes tipos de analitos en una gran variedad de muestras mediante el empleo de la espectroscopia IR [43,84,85].

La técnica PLS participa de las características del análisis PCA en la regresión múltiple. El objetivo es predecir o analizar un conjunto de variables dependientes a partir de un conjunto de variables independientes o predictoras. La predicción se lleva a cabo extrayendo a partir de dichas variables predictoras un conjunto de factores ortogonales llamadas variables latentes (LV) o, simplemente, factores de manera que se construye un modelo de calibración para que tenga la mejor capacidad predictiva al aplicarlo al análisis de muestras diferentes de las utilizadas para la construcción del modelo PLS [86]. Aunque existan muchos factores manifiestos en el conjunto inicial de las variables de las muestras, pueden existir solo unos pocos factores latentes no observables que recojan la mayor parte de la variabilidad de la señales obtenidas a partir de las muestras (espectros IR, en este caso). La idea general del PLS es intentar extraer estos factores latentes, recogiendo la mayor parte de la variación de los factores reales de forma que además sirvan para modelar las variables respuesta de la mejor manera posible [87]. En la regresión PLS las variables espectrales originales se descomponen en variables latentes con el objetivo de establecer la mejor correlación entre la medida instrumental (datos espectrales de la matriz X) y los valores de la propiedad de interés (vector Y que contiene los valores de referencia de la propiedad de interés) [43].

El método de calibración PLS, se ha aplicado en quimiometría como una alternativa a la regresión ordinaria por mínimos cuadrados para la resolución de problemas que presentan grandes colinealidades o en los que se debían calcular variables Y correlacionadas. En la **Figura 33** se muestra, como ejemplo, la representación de las absorbancias a diferentes longitudes de onda en el UV para una serie de muestras de triptófano a diferentes concentraciones. En dicha representación se puede observar el alto grado de correlación entre las variables. Este problema se puede resolver con la construcción de un modelo de regresión PLS, tal como se indica en la **Figura 34** en la que se representa la

predicción de los valores de concentración de las muestras de triptófano realizadas por el modelo PLS establecido frente a los valores reales [88].

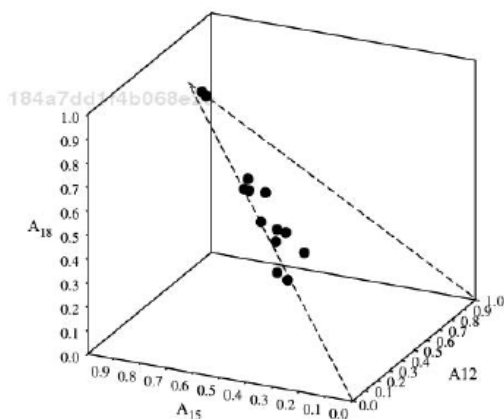


Figura 33. Representación de la absorción (UV-Vis) a tres longitudes de onda diferentes para una serie de disoluciones de triptófano. Fuente: referencia [88].

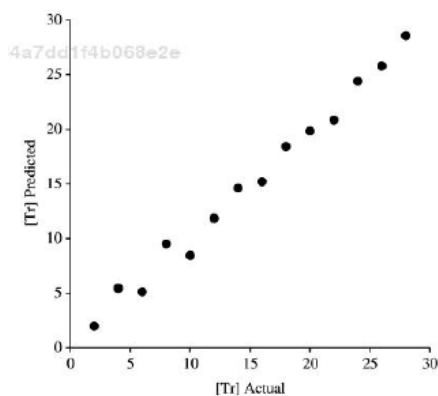


Figura 34. Representación de los valores predichos por el modelo PLS establecido para las muestras de triptófano frente a los valores reales. Fuente: referencia [88].

De modo genérico, la regresión PLS, puede presentarse como una alternativa a la PCR que intenta concentrar el máximo poder predictivo en los primeros componentes principales. Para ello, durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza tanto la información contenida en la matriz de datos espectroscópicos (matriz X) como al contenida en la matriz de concentraciones

(matriz Y). Teniendo en cuenta ambas informaciones el método reduce el impacto de grandes pero irrelevantes variaciones en la matriz X durante el calibrado [89].

Antes de realizar la descomposición en factores, las matrices se centran o autoescalan a varianza unidad, como en el caso del PCA. Cada una de las matrices se descompone en una suma de A factores de forma que simultáneamente se calcula:

$$X = TP^T + E = \sum_{a=1}^A t_a P_a^T + E \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$Y = UQ^T + F = \sum_{a=1}^A u_a q_a^T + F \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde si tenemos M muestras, A factores, k variables y P analitos, las matrices T y U de dimensiones (MxA) son respectivamente las matrices de *scores* de los bloques X e Y. Las matrices P^T y Q^T son las matrices de *loadings* de los bloques X e Y, con dimensiones (AxK) y (AxP); respectivamente. E y F son las matrices de residuales de los bloques X e Y, respectivamente.

En este caso los *loadings* no coinciden con la dirección de máxima variación, como en el caso de PCA, ya que están corregidos para conseguir una óptima capacidad predictiva para la matriz Y [89], con lo que se pierde el sentido físico de los cálculos aunque se gane en capacidad de predicción.

Si solo se desea calcular una única concentración de las presentes en la matriz Y, el algoritmo recibe el nombre de PLS1 y se puede considerar una simplificación del algoritmo global PLS2. En esta Tesis Doctoral se ha empleado el algoritmo PLS1 para la construcción de los modelos PLSR mediante las aplicaciones incluidas en el software OPUS 6.5 de Bruker.

En la calibración se calcula la matriz de regresores \hat{B} y el vector \hat{b}_0 que permiten realizar la predicción de la concentración de un analito en una

muestra sin necesidad de descomponerla en matrices de *scores* y *loadings*. Así, si el espectro de una muestra viene dado por el vector x_i , las concentraciones de los analitos y viene dado por:

$$y_i^\tau = \hat{b}_0^\tau + x_i^\tau \hat{B} \quad (\text{Ecuación 5})$$

El objetivo de la calibración es obtener unos parámetros que permitan calcular la concentración de los analitos objeto de estudio en futuras muestras de forma que para cada objeto i y variable j , la residual de las concentraciones calculadas, f_{ij} , sea el mínimo posible, según la ecuación 6, en la que \hat{y} es la concentración calculada,

$$f_{ij} = \hat{y}_{ij} - y_{ij} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Cuando el número de muestras es relativamente pequeño la metodología a seguir para la construcción del modelo es la validación cruzada (*Cross Validation, CV*), que utiliza muestras del bloque de calibración para comprobar el modelo. El conjunto de muestras de calibración se divide en varios bloques o segmentos. El modelo se construye tantas veces como número de bloques o segmentos se ha elegido, utilizando un segmento como bloque de datos para comprobar resultados y el resto para construir el modelo de forma que cada vez se deja un segmento fuera. Cuando el número de segmentos es igual al número de muestras de calibrado se le denomina procedimiento *Leave-one-out* (LOO), que deja cada vez una muestra fuera y utiliza el resto de muestras para construir el modelo. Si lo que se deja es un grupo de muestras fuera se denomina al procedimiento de validación cruzada como de “ventanas venecianas”. En cualquier caso, la coherencia del modelo de calibración se establece mediante el parámetro denominado *Root Mean Square Error of Prediction by Cross Validation* (RMSECV) para cada factor y cada analito es:

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{M_c} (\hat{y}_i - y_i)^2}{M_c}} \quad (\text{Ecuación 7})$$

donde M_c es el número de muestras utilizadas en la calibración.

Para poder asegurar la bondad del modelo en la predicción de muestras distintas a las utilizadas en la calibración es necesario realizar un proceso de validación del mismo mediante el estudio cuantitativo de los resultados de la aplicación del modelo construido con los datos de calibración a nuevas muestras. Esto se calcula mediante el *Root Mean Square Error of Prediction* (RMSEP):

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{M_{pr}} (\hat{y}_i - y_i)^2}{M_{pr}}} \quad (\text{Ecuación 8})$$

La elección del número de componentes principales o factores que configuran el modelo óptimo es el punto clave en la utilización de cualquier técnica de calibración que realice una compresión de variables. Se han propuesto diferentes formas para deducir el mejor número de componentes principales que se basan, en general, en el análisis del error de predicción al utilizar distinto número de éstos [89].

Para establecer un buen modelo de regresión PLS, esto es, con la adecuada capacidad predictiva, debemos tener en cuenta las siguientes cuestiones [90]:

- El intervalo de longitud de onda de los datos espectrales utilizados para construir el modelo no tiene que incluir necesariamente todo el espectro que proporcione el instrumento empleado para obtener las medidas experimentales. Sin embargo, su restricción para cubrir regiones estrechas alrededor de bandas características del analito

puede comprometer el rendimiento y la robustez del modelo que debe probarse utilizando varias regiones espectrales.

- Se suele realizar un tratamiento previo de los datos de los espectros o señales obtenidos para reducir la variabilidad y mejorar la información resultante acerca de la composición de las muestras, pero un tratamiento inadecuado puede introducir importantes errores o disminuir la relación señal/ruido.
- Se debe seleccionar un apropiado número de factores. Un elevado número de factores favorecerá disponer de un modelo de calibración que se ajuste en mejor medida a las muestras utilizadas para la calibración. Sin embargo disminuirá su capacidad predictiva para el análisis de muestras diferentes a las consideradas en la modelización o calibración. Por este motivo es esencial determinar el número óptimo de factores y evitar añadir más factores cuando empiecen a no ser significativos; ya que de lo contrario estamos produciendo una sobreestimación del mismo con el consiguiente empeoramiento de su capacidad predictiva [91].
- Debe realizarse una correcta identificación de los valores anómalos, los llamados *outliers*, en el conjunto de calibración para proceder a su exclusión.
- El tipo de pre-procesado de los datos originales, el intervalo espectral y el número de factores, deben optimizarse a través de una correcta validación del modelo de calibración. Los datos espectrales, que están centrados en la media, se pueden someter además a otros tratamientos matemáticos como pueda ser la primera deriva, segunda derivada o normalización vectorial, entre otros procedimientos para mejorar los modelos obtenidos.

2.9 Ejemplos de aplicaciones forenses de la espectroscopia MIR y NIR en el análisis de drogas decomisadas

La espectroscopia MIR se ha empleado en el análisis de drogas de abuso tanto para su cuantificación como para el estudio de las sustancias adulterantes y de corte que las acompañan. Algunos ejemplos de ello son la cuantificación de cocaína y heroína mediante pastillas de KBr [92], el desarrollo de un método rápido de identificación para cocaína, heroína y anfetaminas, empleando la espectroscopia micro FT-IR en combinación con test microcristalinos [93], la detección de medicamentos fiscalizados como el diazepam en las huellas dactilares empleado microscopía FTIR [94] o la detección de cocaína en disolución de tetracloroetileno por medidas en el IR medio empleando un chip de microfluidos. [95]. La técnica ATR-FTIR se ha propuesto como método para el *screening* de drogas incautadas en laboratorios clandestinos [96]. Grobèrio *et al* propusieron la diferenciación de cocaína y algunos de sus adulterantes más comunes mediante espectroscopia IR combinada con el empleo de técnicas quimiométricas como el PLS [43]. Marcelo *et al* establecieron una metodología para obtener el perfil de muestras de cocaína (base/sal y adulterantes que contiene y su riqueza) mediante el uso de ATR-FTIR y métodos multivariantes [75].

En cuanto al empleo de la espectroscopia NIR para la determinación de drogas de abuso podemos destacar su utilización en la cuantificación de derivados anfetamínicos [97], como test de *screening* en muestras de anfetamina [98], en la identificación rápida de derivados anfetamínicos combinado con el PCA [99], determinación directa de heroína, 6-acetilmorfina y codeína en muestras procedentes de tráfico ilícito [100], la cuantificación de heroína en muestras de dosis incautadas [84], identificación de diferentes sustancias psicoactivas empleando un equipo portátil [101], la determinación de cocaína en la forma base o sal y algunos de sus adulterantes como son la cafeína, lidocaína y

fenacetina [102], la comparación de la determinación de derivados anfetamínicos mediante modelos PLS por reflexión difusa y transmitancia [103] y la identificación de nuevas sustancias psicoactivas en muestras decomisadas con ayuda de métodos quimiométricos [104].

En la **Tabla 12** se indica a modo de resumen, algunas de las aplicaciones encontradas en la bibliografía basadas en el empleo de la espectroscopia infrarroja, tanto en el MIR como en el NIR. Como puede verse, la mayoría de las matrices estudiadas corresponden a muestras en polvo y sólo en un caso se trabajó con una disolución de cocaína en tetracloroetileno. En cuanto a la determinación de cocaína en al resto de matrices en las que podemos encontrarla en las muestras decomisadas, no se han encontrado aplicaciones por espectroscopia ATR-MIR o DR-NIR para la determinación directa de drogas en tejidos ni tampoco en los casos en los que se le añaden sustancias para interferir en su detección por los test presuntivos habituales como es el caso de la cocaína.

Sin embargo, sí que se han encontrado ejemplos de aplicaciones para la determinación directa de cocaína en tejidos impregnados utilizando la espectroscopia vibracional Raman, como es el caso de los estudios llevados a cabo por Ali *et al* [105,106,107,108].

Tabla 12. Ejemplos de aplicaciones forenses para el análisis de drogas por espectroscopia MIR y NIR.

<u>Año</u>	<u>Técnica</u>	<u>Procesado muestra</u>	<u>Análisis de datos</u>	<u>Analito</u>	<u>Matriz</u>	<u>Ref.</u>
1987	FTIR MIR	Pastillas de KBr	Integración del área de los picos carbonilo	Cocaína y heroína. Adulterantes y diluyentes: azúcares, cafeína y procaína	Polvo	[92]
2007	ATR -FTIR	Medida directa	Comparación con biblioteca	Derivados anfetamínicos	Polvo	[96]
2009	Microscopía FTIR	Medida directa	Algoritmos comparación de espectros	Aspirina, diazepam, cafeína	Huellas dactilares	[94]
2012	MIR	Guía de onda MIR - chip de microfluidos integrado	Medida en tiempo real	Cocaína en disolución de tetracloroetileno	Líquida	[95]
2013	ATR-FTIR	Medida directa	PCA, PLS-DA	Cocaína (Sal/base) Adulterantes: Lidocaína, cafeína y benzocaína	Polvo	[85]
2015	ATR-FTIR	Medida directa	PCA, HCA, PLS-DA SVM-DA PLSR	Cocaína. Cafeína, lidocaína, fenacetina	Polvo	[75]
2015	ATR-FTIR	Medida directa	PLSR PLS-DA,	Cocaína, fenacetina, benzocaína, cafeína, lidocaína y aminopirina	Polvo	[43]
2015	ATR-FTIR	Medida directa	PNN, KNN, LDA	Cocaína sal/base; Adulterantes: Cafeína, lidocaína, fenacetina	Polvo	[102]
1999	NIR	Medida directa	PLSR	Derivados anfetamínicos	Polvo	[97]
1999	NIR	Medida directa	PLS	Derivados anfetamínicos	Polvo	[98]
2003	NIR	Medida directa	PLSR	Derivados anfetamínicos	Polvo	[103]
2007	NIR	Medida directa	PLSR	Heroína, 6-acetilmorfina y codeína	Polvo	[100]
2008	NIR	Medida directa	PLSR	Heroína	Polvo	[84]
2008	NIR	Medida directa	PCA	Derivados anfetamínicos	Polvo	[99]
2014	NIR	Medida directa, equipo portátil	Algoritmos comparación de espectros	Cocaína y diferentes sustancias psicoactivas y diluyentes	Polvo	[101]
2016	NIR	Medida directa	PCA	NPS	Polvo	[104]

3

Parte experimental

3.1 Instrumentación utilizada

A continuación se pasa a describir la instrumentación utilizada en el desarrollo de los trabajos que forman parte de esta Tesis Doctoral.

3.1.1 Cromatógrafo de gases con detector FID

Para la cuantificación de las muestras de cocaína se utilizó un cromatógrafo de gases 7890A marca Agilent (Palo Alto, CA, USA)(**Figura35**), provisto de un detector de ionización de llama (*Flame Ionization Detector*, FID) y una columna capilar HP-5, de dimensiones 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm . Dispone de un sistema de inyección automático con *split/splitless* de manera que se puede inyectar la muestra completa (*splitless*) o solo una parte (*split*) seleccionando la fracción que se prefiera (1/10, 1/25, etc). El sistema de inyección dispone de un muestreador para 100 viales. Como gas portador se ha utilizado nitrógeno. El equipo se controla con el software *ChemStation* de Agilent (Palo Alto, CA, USA) Rev B.04.03 (16).



Figura 35. Cromatógrafo de gases con detector FID modelo Agilent 7890A utilizado para obtener los valores de referencia de las muestras de cocaína.

3.1.2 Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas

Para la identificación tanto de la cocaína como de las sustancias adulterantes presentes en las muestras se ha utilizado un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Agilent (Palo Alto, CA, USA) modelo 6890N-5973 (Figura 36). Está provisto de un inyector automático *split/splitless*, una columna capilar HP-5 MS UI de Agilent (Palo Alto, CA, USA), de dimensiones 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm , una fuente de iones para ionización electrónica y un analizador de masas tipo cuadrupolo. Se controla con el software *MSD ChemStation* de Agilent (Palo Alto, CA, USA) versión E.02.02.1431. Dicho software permite la comparación con hasta tres bibliotecas de espectros. En nuestro caso se ha trabajado con las bibliotecas: *Wiley Library*, *Pfleger-Maurer-Weber Drugs and Pesticides Library for Toxicology (PMW_Tox_3)* y la *SWGDRUG Library*.



Figura 36. Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6890N-5973 utilizado para el análisis cualitativo de las muestras de referencia.

3.1.3 Espectrofotómetro FT-NIR

Para la adquisición de los espectros de las muestras sólidas y soportes impregnados por espectroscopia DR-NIR se ha empleado un espectrofotómetro por transformada de Fourier (FT-NIR) modelo Multipurpose Analyzer (MPA) de Bruker (Bremen, Alemania) (**Figura 37**). Este equipo permite la obtención de medidas por transmisión, reflexión difusa y transreflectancia y para ello está equipado con una fuente de lámpara de tungsteno, un divisor de haz de cuarzo y un detector del tipo TE-InGaAs. Dispone de una esfera integradora que se utiliza como accesorio de medida y de una sonda de fibra óptica para medida de las muestras de forma directa por reflectancia difusa y por transreflectancia.



Figura 37. Espectrofotómetro FT-NIR Multipurpose Analyzer de Bruker con el que se han realizado tanto medidas directas en vial de vidrio como medidas con sonda de fibra óptica.

El equipo se controla con el *software* de OPUS 6.5 de Bruker (Bremen, Alemania). Este programa está diseñado para el análisis de rutina y permite realizar la adquisición de los espectros, así como llevar a cabo la manipulación de los mismos, disponiendo de aplicaciones para el análisis cualitativo y cuantitativo.

3.1.4 Espectrómetro FT-IR con accesorio ATR

Para la adquisición de los espectros de las muestras sólidas y de soportes impregnados por espectroscopia ATR-MIR se ha empleado un espectrofotómetro por transformada de Fourier (FT-IR) modelo *SpectrumTwo* de Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA) equipado con un accesorio micro ATR de una sola reflexión con cristal de diamante. (**Figura 38**). Este accesorio dispone de una prensa para ejercer presión sobre las muestras, que se monitoriza a través del *software* de control del instrumento. El equipo está provisto de un detector de sulfato de triglicina deuterada (DTGS), divisor de haz de KBr y fuente de IR medio. Para la adquisición de los espectros se utiliza el *software* Spectrum Perkin-Elmer versión 10.03.06.



Figura 38. Espectrofotómetro FT-IR *SpectrumTwo* de Perkin Elmer con el accesorio μ ATR.

3.1.5 Espectrofotómetro FT-IR IFS 66/vS Bruker

La adquisición de los espectros de las muestras de cocaína en disolución por espectroscopia ATR-MIR, se ha realizado con un espectrofotómetro FT-IR IFS 66/vS de Bruker (Bremen, Alemania), equipado con una fuente Globar refrigerada por agua, un divisor de haz de KBr y un detector fotoconductor de alta sensibilidad de tipo MCT (Mercurio-Cadmio-Teluro) refrigerado con nitrógeno líquido (**Figura 39**). Las medidas se han realizado utilizando un accesorio ATR Dura Sample IR, de la marca Smiths Detection Inc. (Warrington, UK), equipado con un elemento ATR de cristal de diamante/ZnSe de nueve reflexiones. Los espectros se obtuvieron trabajando con el compartimento de muestra purgado con aire seco. El equipo se controla mediante el software OPUS 6.5 de Bruker.

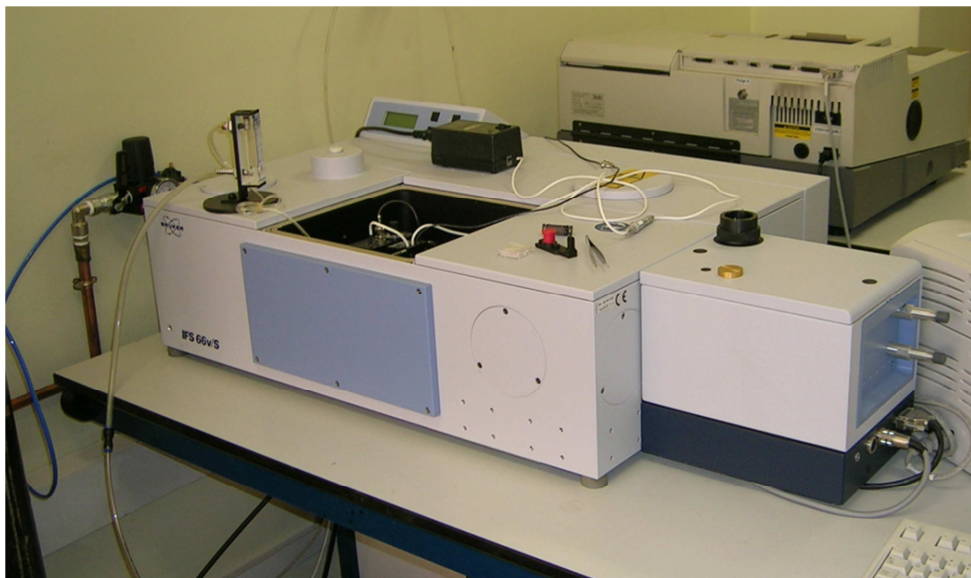


Figura 39. Equipo FT-IR IFS66/vS de Bruker utilizado para la medida de las muestras de cocaína en disolución.

3.2 Muestras y reactivos

Las muestras utilizadas fueron decomisadas en la provincia de Valencia por la Policía y la Guardia Civil y en ellas se había detectado la presencia de cocaína. Se han seleccionado muestras correspondientes a las diferentes presentaciones en las que se suele encontrar la cocaína: muestras en polvo, soportes impregnados, cocaína en disolución acuosa y cocaína mezclada con sustancias que enmascaran las pruebas presuntivas de identificación. A continuación se describen las principales características de las muestras con las que se ha trabajado.

3.2.1 Muestras de cocaína en polvo

Se utilizan muestras de cocaína en polvo, tanto procedentes de cocaína a granel (pastillas o “ladrillos” de 1 kg de cocaína) como de dosis para el menudeo y consumo.

Para el estudio inicial por DR-NIR se emplearon 78 muestras de cocaína en polvo incautadas durante 2009 y 2010, de las que 54 corresponden a cocaína a granel y 24 a menudeo, con una riqueza (expresada en cocaína base) comprendida entre el 11.4 % (p/p) y el 86.4 % (p/p), con las cuales se estableció un modelo PLSR. Un grupo de 11 muestras de cocaína a granel, diferentes de las consideradas en el conjunto de calibración y en el de test, y una muestra de cocaína compactada de 1 kg medida en 10 puntos diferentes se utilizaron para la evaluación de la capacidad predictiva del modelo PLSR establecido.

Se realizó un segundo estudio con muestras de cocaína en polvo por ATR-MIR. En este caso se analizaron 568 muestras de dosis y 100 de cocaína a granel por el método de referencia GC-MS para determinar los adulterantes presentes. De las 568 se tomaron 126 muestras de manera que estuvieran presentes todas

las combinaciones de adulterantes encontradas, excepto aquellas combinaciones que por su baja frecuencia se consideran anecdóticas. Se determinó la concentración de cocaína base de estas muestras, que está comprendida entre 4.24 % (p/p) y 82.4 % (p/p) mediante procedimientos de referencia. Los adulterantes presentes en las muestras fueron principalmente fenacetina, cafeína, levamisol, tetracaína, lidocaína y procaína. Las muestras para la calibración se seleccionaron en función del adulterante detectado, de manera que tanto en el conjunto de calibración como en el conjunto de validación hubiera al menos una muestra de cada combinación encontrada. Con 76 de estas muestras se elaboró un modelo de calibración PLS. 40 muestras se reservaron para la validación del modelo. Un conjunto de 10 muestras nuevas se utilizaron para comparar resultados obtenidos con los del método de referencia y evaluar la capacidad de predicción del método.

Se prepararon además mezclas de cocaína y adulterantes en diferentes proporciones, para crear un método cualitativo que nos permitiera detectar los adulterantes presentes en las muestras a través de sus espectros ATR-MIR.

Con objeto de ampliar el primer estudio DR-NIR, en el que no conocíamos los adulterantes presentes en cada una de las muestras, y considerando que el número de muestras utilizadas de cocaína a granel (54 muestras) era muy superior al de muestras de dosis (24 muestras) se trabajó con muestras reales de las que se conocía su composición en adulterantes y muestras preparadas de cocaína con diferentes adulterantes en diferente proporción, considerándose un total de 198 muestras adicionales.

3.2.2 Muestras de soportes impregnados

Los soportes impregnados que se han utilizado en estos estudios, atendiendo a sus características externas, son de cuatro tipos:

- Láminas de tejido de fieltro blanco, de dimensiones aproximadas 20x40 cm y espesor de entre 1-2 mm.
- Lámina de tejido de fieltro negro, también de dimensiones aproximadas 20x40 cm y espesor de entre 1-2 mm.
- Lámina de pasta de papel de dimensiones 6x4 cm y espesor de 2 mm.
- Espuma impregnada de color gris de dimensiones 4x3cm y espesor 0.5 cm.

Dos de las láminas blancas y la lámina negra se utilizaron para construir un modelo PLSR. La lámina blanca restante, la lámina de cartón y la espuma impregnada se utilizan para la comparación con el método de referencia.

Para la caracterización de los soportes, se procedió a lavarlos durante 72 horas por inmersión en etanol, cambiando cada 24 horas el líquido de lavado. Posteriormente se dejó secar y se compararon los espectros con los obtenidos para tejidos de diferente naturaleza. En la **Figura 40** se muestran los espectros del soporte blanco una vez lavado y eliminados los restos de cocaína comparados con los espectros obtenidos para tejidos de lana, algodón, mezcla de algodón/poliéster y fieltro de poliéster, respectivamente. Como se puede observar el espectro del soporte blanco una vez lavado y eliminada la cocaína coincide con el de fieltro de poliéster, no así con el resto de materiales donde se aprecian diferencias en las bandas del espectro.

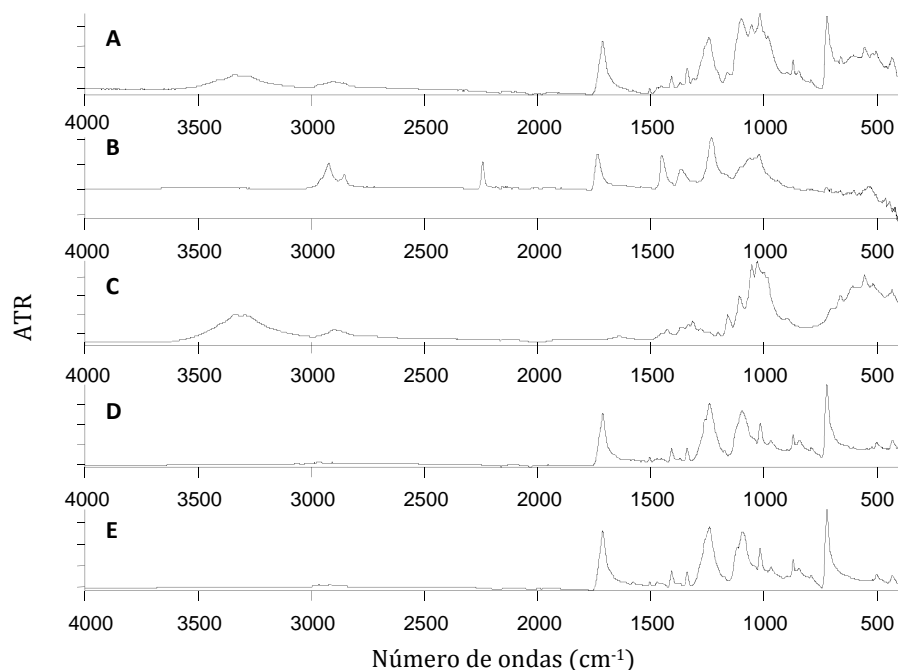


Figura 40. Espectros ATR-MIR. A. Tejido de algodón/poliéster. B. Tejido de lana. C. Tejido de algodón. D. Filtro de poliéster. E. Soporte blanco lavado.

El tejido de fieltro de poliéster es el que más habitualmente suele encontrarse como soporte impregnado para la cocaína. Se puede conseguir muy fácilmente en cualquier comercio de telas, papelería o tienda de manualidades, ya que su uso es muy frecuente para estos fines. En cuanto al soporte impregnado de color negro, a simple vista parece muy diferente al de fieltro de poliéster blanco. Al obtener el espectro ATR-MIR una vez lavado y eliminados los restos de cocaína, se aprecian espectros similares para los soportes blanco y negro, si bien el soporte negro parece que tenga algo de algodón, y que se trate por tanto de una mezcla poliéster/algodón, pero con una proporción diferente a la del tejido con el que se ha comparado (**Figura 40**, espectro A).

En el caso de la espuma impregnada, sí que se comprobó que las bandas de absorción que aparecen son claramente distintas a las de los tejidos ensayados (**Figura 41**), por lo que se puede concluir que se trata de materiales totalmente diferentes. De los soportes de pasta de papel no se han podido obtener espectros para su caracterización, ya que al lavarlos no fue posible recuperarlos.

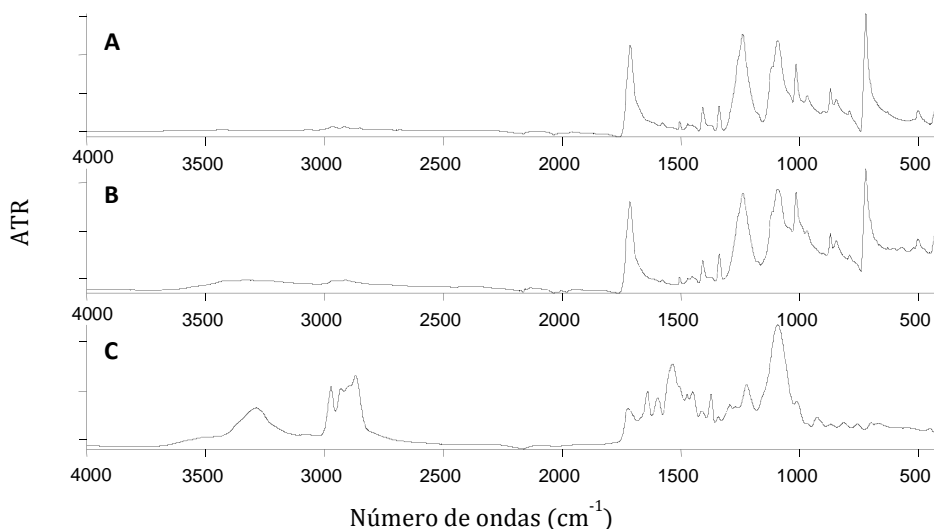


Figura 41. Espectros ATR. A. Soporte impregnado blanco lavado. B. Soporte impregnado negro lavado. C. Espuma lavada.

3.2.3 Muestras de cocaína en disolución acuosa

Se ha trabajado con muestras de cocaína en disolución acuosa azucarada camuflada bajo la denominación de “vinagres de fruta”, empleando un total de 53 muestras sospechosas de contener cocaína y se han preparado patrones acuosos de cocaína clorhidrato. En las 31 botellas donde finalmente se detectó cocaína, al enfriarlas, se observaba una especie de separación de fases, a diferencia del resto para las que se obtuvo una disolución transparente totalmente homogénea. Dicha separación de fases desaparecía fácilmente por simple agitación manual de la muestra.

3.2.4 Muestras de cocaína en polvo mezclada con sustancias que enmascaran el test de tiocianato de cobalto

Se han empleado muestras reales de un decomiso de cocaína camuflada con apariencia de café y muestras preparadas de cocaína y café molido de tueste natural. Así como una muestra de cocaína negra compactada.

3.2.5 Reactivos empleados

Para la preparación de las disoluciones patrón se utilizó cocaína clorhidrato, patrón de referencia certificado, de la marca Lipomed (Arlesheim, Switzerland), cafeína $\geq 99\%$ marca Guinama (Alboraya, Spain), levamisol clorhidrato $\geq 99\%$ marca Guinama (Alboraya, Spain), tetracaína clorhidrato $\geq 99\%$ marca Guinama (Alboraya, Spain), procaina clorhidrato $\geq 99\%$ marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), lidocaína $\geq 99\%$ marca Guinama (Alboraya, Spain) y fenacetina (4-etoxiacetanilida) patrón proveniente de un decomiso.

Para la calibración por cromatografía se ha empleado como patrón interno tetracosano (Fluka, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) preparado al 0.02 % m/v en etanol absoluto grado análisis (Panreac, Barcelona, Spain). En el caso de los patrones acuosos de cocaína se empleó agua ultra pura como disolvente y también como blanco.

3.3 Procedimientos de referencia

Como procedimientos de referencia para establecer los valores de concentración de cocaína en las muestras y validar las predicciones de los métodos desarrollados se utilizaron los procedimientos cromatográficos recomendados por Naciones Unidas.

3.3.1 Preparación de patrones y muestras

Para establecer la recta de calibrado se prepararon seis disoluciones patrón de cocaína clorhidrato en disolución de tetracosano al 0.02 % m/v en etanol absoluto, en un intervalo de concentraciones comprendido entre 0.10 mg mL⁻¹ y 2.00 mg mL⁻¹.

En cuanto a la preparación de las muestras para su análisis por cromatografía, ésta va a depender del tipo de matriz que presenten:

- En el caso de muestras en polvo se pesó una cantidad comprendida entre 10 y 20 mg de muestra homogenizada que se disolvió en 8 mL de etanol conteniendo tetracosano como patrón interno y tras sonicar la muestra durante tres minutos en un baño de ultrasonidos, se llevó a un volumen final de 10 ml. Una vez disuelta la cocaína las disoluciones se filtran a través de membrana de 0.47 µm antes de la inyección en el cromatógrafo.
- Para las muestras impregnadas, tras el muestreo del soporte impregnado (que consiste en dividir el mismo en cuadrantes y tomar porciones de cada uno de éstos de aproximadamente un gramo) las porciones obtenidas se sumergieron y se dejaron en agitación durante 24 horas en 50 ml de etanol conteniendo tetracosano como patrón interno. Posteriormente se realizó una dilución 1/10.

- En el caso de las muestras líquidas, tras homogeneizarlas completamente mediante agitación manual, se pesó entre 30 y 40 mg de muestra que se disolvió en 10 mL de etanol conteniendo tetracosano como patrón interno.

3.3.2 Análisis cualitativo de las muestras por GC-MS

La determinación en las muestras de los adulterantes y la confirmación de la presencia de cocaína se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Tras el tratamiento de la muestra se inyectaron 0.5 μL en modo automático sin división de flujo (*splitless*). Como gas portador se utilizó helio y la temperatura del inyector fue de 280°C. El programa del horno va desde una temperatura inicial de 70°C hasta una final de 250°C, con una rampa de calentamiento de 25°C min^{-1} . En este caso se empleó una columna capilar HP-5M UI (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Los parámetros instrumentales del método se resumen en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Parámetros instrumentales del método GC-MS para la determinación de cocaína.

PARÁMETROS		
Instrumento	GC-MS Agilent6890N-5973	
	Modo	Automática
	División de flujo (<i>Split</i>)	No (<i>Splitless</i>)
Inyección de la muestra	Tª inyector	280°C
	Volumen de inyección	0.5 μL
	Gas portador	He
	Flujo	1.5 ml min^{-1}
Horno	Tª inicial	70°C
	Incremento	25°C min^{-1}
	Tª final	250°C
	Periodo isotérmico	10 min
Columna	Columna capilar HP-5M UI (30 m x 0.25mm x 0.25 μm)	
Rango de masas	50-550 uma	
Modo de adquisición	Full scan	
Tipo de ionización	Ionización electrónica	
Tª de la fuente	230°C	
Analizador de masas	Cuadrupolo	

3.3.3 Determinación del contenido en cocaína de las muestras por el método de referencia de GC-FID

El método de referencia que se ha empleado se basa en el propuesto en las Recomendaciones de Naciones Unidas consistente en el empleo de la cromatografía de gases con detector de ionización de llama [2]. Se inyectaron 0.5 μL de muestras o patrones en modo automático con un división de flujo (*split*) de 1/10 a una temperatura de 280°C. Como gas portador se empleó nitrógeno con un caudal de 7.0 mL min^{-1} . La columna utilizada es una capilar Agilent tipo HP-5, de dimensiones 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm , siendo la temperatura del horno de 220°C (modo isoterma) y la del detector de 280°C. La duración total del método fue de 5 minutos. Los parámetros instrumentales se resumen en la **Tabla 14**.

Para la cuantificación se ha empleado el pico de la cocaína que aparece a 2.48 min y el del tetracosano a 3.46 min.

Tabla 14. Parámetros instrumentales del método GC-FID para la determinación de cocaína.

PARÁMETROS		
Instrumento	GC-FID Agilent7890A	
	Modo	Automática
	División de flujo (<i>Split</i>)	1/10
Inyección de la muestra	Tª inyector	280°C
	Volumen de inyección	0.5 μL
	Gas portador	N ₂
	Flujo	7.0 mL min^{-1}
Horno	Isotérmico	220°C/ 5 min
Columna	Columna capilar HP-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm)	

3.4 Procedimientos de medida en el infrarrojo

A continuación se detallan los métodos utilizados para la obtención de los espectros tanto en el NIR como en el MIR.

3.4.1 Infrarrojo próximo (NIR)

Se obtuvieron los espectros de muestras en polvo y muestras impregnadas de cocaína.

3.4.1.1 Medidas por reflexión difusa (DR-NIR) de muestras en polvo

Para las medidas por DR-NIR de las muestras de polvo se empleó el espectrofotómetro FT-NIR MPA utilizando la esfera integradora. Las muestras pulverizadas se introdujeron en viales de vidrio transparente, de los que comúnmente se emplean para los muestreadores automáticos en cromatografía, de 9.5 mm de diámetro interno y 2 ml de capacidad. Fue suficiente una cantidad de entre 50-75 mg de las muestras en polvo para crear una capa de dos milímetros de espesor en el interior del vial.

Los espectros NIR de las muestras se obtuvieron en el intervalo comprendido entre 13500 y 3500 cm^{-1} , trabajando con una resolución de 4 cm^{-1} , que es la resolución estándar del equipo, acumulando 50 barridos (*scans*) por espectro, frente a un *background* establecido a partir de la esfera integradora del espectrómetro en modo cerrado y en las mismas condiciones instrumentales que las muestras. El espectro final se corrigió para obtenerlo en unidades de Kubelka-Munk, ya que se realizó un tratamiento cuantitativo posterior y ello mejora la relación entre la señal y la concentración. Se tomaron tres medidas de cada una de las muestras variando la posición del vial por rotación manual (aproximadamente 120°) para incrementar la variabilidad de los espectros y la representatividad del muestreo.

3.4.1.2 Medidas por reflexión difusa con sonda de fibra óptica (DR-NIR) de soportes impregnados

Para las medidas de las muestras de soportes impregnados se utilizó el mismo equipo que en el caso de las muestras de polvo (FT-NIR modelo MPA). En este caso, las medidas se realizaron por reflexión difusa utilizando la sonda de fibra óptica, en la región NIR (14000 a 3900 cm^{-1}) con una resolución de 4 cm^{-1} acumulando 50 barridos por espectro, utilizando un *background* del estándar de reflectancia difusa Spectralon® (fluoropolímero que presenta reflectancia difusa mayor a cualquier otro material en las regiones UV, visible y NIR). Las medidas se tomaron realizando un mapeo de los soportes, de manera que se dividió éste en cuadrantes y se tomaron medidas en cada uno de ellos apoyando la sonda sobre el soporte, tal como se muestra en la **Figura 42**, y limpiándola con papel suave de celulosa entre cada medida. Posteriormente se realizó a los espectros una corrección de Kubelka-Munk.



Figura 42. Medida de una lámina de tejido de fieltro impregnado con cocaína empleando sonda de DR-NIR.

3.4.2 Infrarrojo medio (MIR)

En el infrarrojo medio se obtuvieron los espectros de muestras sólidas y líquidas utilizando accesorios ATR.

3.4.2.1 Medidas por reflexión total atenuada (ATR) de muestras en polvo

Para la obtención de las medidas se empleó el espectrofotómetro FT-IR *SpectrumTwo* de *Perkin Elmer*. Las muestras de polvo, cuyo contenido en cocaína y adulterantes se determinó previamente por el método de referencia GC-FID, se hicieron por contacto directo con el cristal ATR ejerciendo una presión constante de 85 unidades con una punta o *tip* de 3 mm de diámetro, trabajando a una resolución de 4 cm⁻¹ en el intervalo espectral de 4000 a 400 cm⁻¹ y acumulando 10 barridos o *scans* por espectro. El espectro se obtuvo frente a un *background* de la celda vacía y limpia y se le aplicó la corrección ATR, que va a permitir hacer una mejor comparación de los espectros. Una vez registrado el espectro, se retiró la muestra con ayuda de una espátula de plástico y se limpió el cristal del accesorio con agua y etanol. Se secó con un papel suave de celulosa y se realizó una medida para comprobar que se recuperaba la línea base. Las medidas se tomaron por triplicado y posteriormente se obtuvieron los espectros promedio con los que se trabajó para elaborar los modelos PLS.

3.4.2.2 Medidas por reflexión total atenuada (ATR) de soportes impregnados

Empleando el mismo espectrofotómetro que se ha indicado en la sección anterior, los soportes impregnados que ya se habían medido con la sonda de DR-NIR se muestrearon, tomando para ello diferentes porciones de aproximadamente 4x3 cm², y se midieron en el intervalo espectral de 4000 a 400 cm⁻¹ por contacto directo con el cristal ATR, frente a un *background* de la celda limpia, ejerciendo una presión de 85 unidades con un *tip* de 3 mm de

diámetro. Entre cada medida se limpió el cristal del accesorio ATR con agua y etanol y se secó con papel suave de celulosa y se hizo una medida para comprobar que se recuperaba la línea base. Las medidas se hicieron por una y otra cara en el mismo punto del soporte (Figura 43).



Figura 43. Procedimiento de medida por ATR-MIR de soportes impregnados de cocaína.

3.4.2.3 Medidas por reflexión total atenuada (ATR) de muestras líquidas

Para la obtención de los espectros de muestras de cocaína disuelta en disoluciones azucaradas, se utilizó un espectrofotómetro FT-IR IFS 66/vS con un accesorio ATR DuraSampleIR II con una celda de 9 reflexiones. Después de homogenizar adecuadamente las muestras mediante agitación manual, con la ayuda de una micro jeringa de volumen muerto cero (Hamilton, serie 7005) se depositaron 5 μl de la muestra sobre el cristal del accesorio de ATR, previamente limpio y seco. Se cubrió la celda con una pieza de cristal con el fin de evitar la evaporación de la disolución y se obtuvo el espectro IR en la región de 4000 a 400 cm^{-1} , por acumulación de 100 barridos del interferómetro, con una velocidad de 100 KHz (detector MCT) y una resolución nominal de 4 cm^{-1} . El espectro se registró por triplicado frente a un *background* de la celda limpia y vacía. Al espectro obtenido se le aplicó una corrección ATR. Siguiendo el mismo procedimiento se obtuvieron medidas por triplicado de patrones acuosos de cocaína y blancos de agua.

3.5 Desarrollo de métodos cualitativos para la determinación de cocaína y sus adulterantes

Los métodos cualitativos se han desarrollado utilizando los espectros de patrones y muestras e identificando las bandas principales de los compuestos considerados.

3.5.1 Método cualitativo para la identificación de cocaína y sus adulterantes

Para la identificación de la cocaína y los adulterantes presentes en las muestras se ha establecido un método en dos pasos con la ayuda del software OPUS 6.5 de Bruker: 1) comparación de la muestra con una biblioteca de muestras creada a tal efecto y 2) realización de un test de conformidad para la identificación de los adulterantes teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el paso 1).

- Comparación del espectro ATR-MIR problema con una biblioteca de espectros creada con muestras de composición conocida.

La opción de búsqueda de espectros (*spectrum search*) del programa OPUS permite identificar espectros desconocidos por comparación con los de una biblioteca. En este caso se creó una biblioteca con los espectros de las combinaciones de adulterantes más comunes y con un espectro de un patrón de cocaína clorhidrato. La opción de búsqueda se puede configurar, de manera que pueden excluirse regiones del espectro para la comparación y seleccionar el algoritmo de búsqueda más apropiado. En el caso de las muestras adulteradas, los soportes impregnados y la cocaína mezclada con café se empleó el algoritmo estándar y se realizó la comparación utilizando todo el intervalo espectral. Este algoritmo estándar toma en consideración no sólo la frecuencia a la que aparecen las bandas de los espectros que se comparan sino también las intensidades relativas de las mismas. Además

permite definir si el espectro a comparar proviene de una muestra con un componente o con varios. En el caso de que se trate de un solo componente aplica un factor que reduce la calidad del índice de comparación (*hit*) de los espectros, esto es, el valor que indica el grado de similitud de los mismos, si el número de bandas del espectro de la librería es menor al del espectro problema [109].

En el caso de las muestras de cocaína negra compactada se comprobó que el algoritmo estándar no era adecuado y se utilizó el que considera la correlación espectral, seleccionado el pre-tratamiento y las regiones espectrales más adecuadas. Este algoritmo calcula la suma de los cuadrados de las desviaciones entre el espectro problema y el espectro resultado para los puntos de datos del intervalo espectral definido. Además permite incluir una normalización o trabajar con la derivada del espectro [109].

Los resultados a partir de los espectros de la biblioteca aparecen presentados de forma ordenada en función del índice de calidad, de modo decreciente en su similitud. Inicialmente seleccionamos los dos espectros con un índice de calidad superior y los sometemos a una segunda identificación a modo de confirmación, consistente en la comparación del espectro por un método de conformidad (*Ident*) para cada uno de los adulterantes que presumiblemente se encuentran presentes en la muestra según los resultados obtenidos en el test inicial de comparación con la biblioteca.

- Realización de un test de conformidad (*Ident*) que confirma la presencia de cada uno de los adulterantes.

La función *Ident* del programa OPUS se utiliza principalmente para el control de calidad, ya que su objetivo es detectar desviaciones entre un espectro de referencia y un espectro problema. Con ella, se define un

método que determine la similitud de los espectros y se establece un umbral (*threshold*) de aceptación. Existen dos algoritmos para la comparación: el estándar y el de factorización. En nuestro caso hemos empleado el algoritmo estándar. Este método utiliza para la comparación de los espectros la distancia Euclídea, que es proporcional al área entre las curvas espectrales, tal como puede verse en el ejemplo de la **Figura 44**.

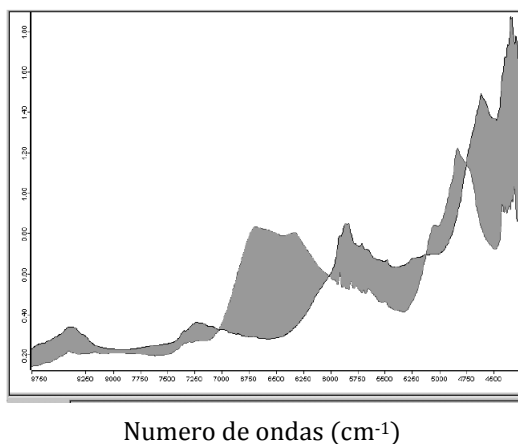


Figura 44. Ejemplo del cálculo de la distancia Euclídea entre un espectro problema y un espectro test. Fuente: referencia [109].

Se configuró un test de conformidad para cada uno de los adulterantes detectados a partir de la comparación inicial con la biblioteca de espectros mediante la función *Search*, seleccionando las regiones espectrales en función de las bandas principales que se observan en el espectro de los adulterantes puros y realizando pruebas con diferentes opciones de pre-tratamiento.

Una vez configurado el método cualitativo para cada adulterante se procedió a la validación de los mismos utilizando para ello 50 de las muestras estudiadas, conjunto en el que están representadas todas las combinaciones de adulterantes encontradas en las muestras consideradas en este estudio.

3.5.2 Método cualitativo para muestras de cocaína en disolución

En el caso de las muestras de cocaína en disolución, el método cualitativo consiste en emplear un test de conformidad para clasificar las muestras en positivas y negativas. El procedimiento para configurar el método es igual al de las muestras en polvo, pero en este caso se ha empleado un solo método por comparación con dos grupos de muestras: patrones de cocaína en disolución acuosa y muestras de agua. El método de conformidad clasifica la muestra en uno u otro grupo. La región del espectro y el pre-tratamiento se han seleccionado teniendo en cuenta la zona donde aparecen las bandas de la cocaína de manera que se obtengan los mínimos falsos positivos y negativos. Un conjunto de muestras reales se empleó para la validación del método.

3.5.3 Criterios de validación para los métodos cualitativos

Para la validación de los test de conformidad se han aplicado los criterios mencionados en el documento de recomendaciones de la ONU para técnicas espectroscópicas [58]. Dicho documento establece que el método analítico debe posibilitar por su especificidad y selectividad el cumplimiento de los objetivos. Los parámetros considerados y su cálculo se muestran en la **Tabla 15**. En este caso se ha determinado:

- Selectividad. Como el porcentaje de verdaderos positivos respecto al total de muestras positivas.
- Especificidad. Como el porcentaje de verdaderos negativos respecto al total de muestras negativas.
- Porcentaje de falsos positivos. Porcentaje de muestras detectadas por el método como positivas, cuando en realidad eran negativas, respecto al número total de muestras detectadas como positivas.

- Porcentaje de falsos negativos. Porcentaje de muestras detectadas por el método como negativas, cuando en realidad eran positivas, respecto al número total de muestras detectadas como negativas.
- Eficiencia del método. Porcentaje de verdaderos positivos y negativos respecto al número total de muestras.

Tabla 15. Parámetros considerados para la validación del método cualitativo. Nota: **a**, número de verdaderos positivos; **b**, falsos negativos; **c**, falsos positivos; **d**, verdaderos negativos; y **n**, número de muestras.

Parámetros considerados en la validación

$$\text{Selectividad} \quad S = \frac{a}{a+b} \times 100 \quad (\text{Ecuación 9})$$

$$\text{Especificidad} \quad E = \frac{d}{c+d} \times 100 \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$\text{Falsos Positivos} \quad FP = \frac{c}{a+c} \times 100 \quad (\text{Ecuación 11})$$

$$\text{Falsos negativos} \quad FN = \frac{b}{b+d} \times 100 (\text{Ecuación 12})$$

$$\text{Eficiencia} \quad EF = \frac{a+d}{n} \times 100 (\text{Ecuación 13})$$

3.6 Construcción y evaluación de modelos de regresión PLS y aplicación de métodos de reconocimiento de pautas

Se han empleado métodos de reconocimiento de pautas y se han construido modelos PLS para la identificación y determinación de cocaína en las diferentes matrices consideradas en este estudio: muestras en polvo, soportes y tejidos impregnados, muestras líquidas y cocaína mezclada con sustancias que enmascaran los test presuntivos de color.

De forma genérica, para la construcción de los modelos PLS los espectros de cada tipo de muestras se dividen en dos grupos independientes, uno de calibración y otro de validación o test, y se construye un modelo de regresión PLS seleccionando el pre-procesado de los datos, intervalos espectrales y número de factores (variables latentes) que proporcione mayor capacidad predictiva para la cuantificación de cocaína en las muestras del conjunto de validación. La selección de los conjuntos de calibración y validación se ha realizado de diferente manera en cada uno de los casos, lo que se detalla en los apartados siguientes.

Para la construcción de modelos PLS y la aplicación de métodos de reconocimiento de pautas hay *software* disponible con diferentes prestaciones. Como ya se ha comentado en este estudio se ha empleado el Programa OPUS versión 6.5 de Bruker.

A partir de la información encontrada en la bibliografía, las técnicas de reconocimiento de pautas se han empleado para el tratamiento de los datos analíticos obtenidos de muestras decomisadas con objeto de investigar y establecer posibles nexos en cuanto a la procedencia de las mismas. Estos trabajos se han realizado basándose en el análisis de los restos de disolventes presentes en las muestras y determinados mediante HS-GC/MS [110], en el origen geográfico del cultivo a partir del estudio de los alcaloides y del análisis

isotópico de los componentes presentes en las muestras [111,112], a través del estudio mediante FT-IR y GC-MS de los alcaloides y de los disolventes residuales [74] o a través del estudio del contenido en metales [113]. Trabajando con métodos de reconocimiento de pautas, también se ha considerado la detección de billetes contaminados con cocaína [114], el reconocimiento de perfiles de cocaína a partir de la información contenida en una base de datos [115], la clasificación de muestras de cocaína en forma de base o clorhidrato y la determinación del perfil de adulterantes a partir de medidas FT-IR [75] o la clasificación de muestras de derivados anfetamínicos a través del perfil de impurezas e isótopos presentes [116].

En esta Tesis Doctoral, se han empleado técnicas de reconocimiento de pautas (HCA, PCA) para la selección de los conjuntos de calibración y validación de los modelos PLS construidos, para la caracterización de lotes o partidas en las muestras, su clasificación en muestras de dosis y a granel [1], y para comprobar la idoneidad de los modelos construidos para su empleo en muestras problema.

La selección de los conjuntos de calibración y de validación se ha realizado de manera diferente en cada uno de los estudios o aplicaciones planteadas a lo largo de la presente Tesis Doctoral. A continuación se pasa a describir cada una de ellas.

Para la determinación de cocaína en muestras sólidas por medida directa DR-NIR en viales de vidrio los espectros obtenidos se clasifican mediante un análisis *cluster* (HCA) que permite hacer una separación entre muestras a granel y muestras de dosis, que a su vez se diferencian en distintos *clusters*. Para la selección de las muestras del conjunto de calibración se siguieron las siguientes reglas [117]:

- En el conjunto de calibración se deben incluir muestras de todos los *clusters* obtenidos.
- El número de muestras de cada *cluster* incluidas en el conjunto de calibración debe ser de al menos 1 o la raíz cuadrada del total de las contenidas en cada grupo.
- El resto de muestras que no se han usado para la calibración, se deberán incluir en el conjunto de validación.

Adicionalmente, para asegurar que se había obtenido un conjunto de calibración adecuadamente representativo del total de las muestras, se aplicó un PCA y se observó la distribución de las muestras a partir de la representación gráfica de los *scores*.

Para la determinación de cocaína y sus adulterantes en muestras sólidas por medida directa ATR-MIR se asignaron las muestras al conjunto de calibración o validación teniendo en cuenta el adulterante presente, de modo que fueran representativas del total. Para verificar la correcta asignación de las muestras nos servimos también de un PCA.

En cuanto a la determinación de cocaína y sus adulterantes por medida directa DR-NIR al igual que en el caso anterior, las muestras se asignaron al conjunto de calibración o de validación en función del adulterante presente. Para la confirmación de una correcta asignación de las muestras nos hemos valido también de un PCA, comprobando que se produce una distribución homogénea de las mismas.

En lo referente a la determinación de cocaína en tejidos impregnados por medida directa con sonda DR-NIR y por ATR-MIR, la distribución de las muestras en los conjuntos de calibración y validación se realizó en este caso de manera que aproximadamente la mitad de los espectros correspondientes a las medidas tomadas en los diferentes puntos de los soportes impregnados

quedasen en el conjunto de calibración y la otra mitad en el de test, procurando que el número de espectros empleados de cada soporte impregnado fuera similar. Una vez hecho esto, la asignación de cada espectro se realizó de manera aleatoria después de aplicar un PCA.

Para la determinación de cocaína en disolución en el conjunto de calibración se introdujeron únicamente patrones de cocaína preparados en agua y blancos de agua. En el conjunto de validación se emplearon muestras reales que resultaban representativas del total del conjunto, por lo que para su selección se empleó un HCA.

En la determinación de cocaína en muestras con apariencia de café, adicionalmente se construyó un modelo PLS específico. Para la calibración se emplearon mezclas preparadas a partir de una muestra de cocaína y café molido de tueste natural a diferentes concentraciones, así como patrón de cocaína clorhidrato. La muestra de cocaína que se utiliza es una de cocaína clorhidrato de elevada pureza, que en el análisis cualitativo el sistema la considera como pura. Para la validación del modelo se consideraron muestras reales y mezclas preparadas a partir de muestras de cocaína y café molido.

3.6.1 Evaluación de los modelos construidos

En cuanto a la evaluación de los modelos PLS que se han construido, la calidad de la calibración se evaluó a partir de la raíz cuadrada del error de estimación al cuadrado (**RMSEE**) de los valores reales (y_i) frente a los valores predichos (y_{cal}) durante el proceso de calibración del modelo que se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{RMSEE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{m_{cal}} (y_i - y_{cal})^2}{M_{cal}}} \quad (\text{Ecuación 14})$$

Siendo M_{cal} el número de los patrones/muestras considerados para la calibración.

La bondad del ajuste se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2) de los valores predichos por el modelo frente a los valores verdaderos.

Por su parte, la capacidad predictiva del modelo desarrollado cuando se aplica al conjunto de calibración se evaluó mediante la raíz cuadrada del error de validación cruzada (**RMSECV**), de manera que un modelo con menor RMSECV poseerá mayor capacidad predictiva para las muestras de calibración.

Para validar el modelo PLS se usó un segundo conjunto independiente externo, de muestras no utilizadas en la calibración, y se determinó la capacidad predictiva del modelo sobre este conjunto de muestras calculando el error en la predicción de los resultados de las mismas. Para evaluarla, se empleó la raíz cuadrada del error de predicción al cuadrado (**RMSEP**). Además, como estimación de la bondad del modelo PLS también se empleó el cociente entre la desviación estándar de las muestras del conjunto predicción y el error estándar de predicción (**SEP**), que se denomina **RPD**.

$$RPD = \frac{S_d}{SEP} \quad (\text{Ecuación 15})$$

Como resulta evidente, la capacidad predictiva del modelo para el conjunto de muestras de validación será mayor cuanto menor sea el valor de RMSEP. En cuanto al sentido de los valores de RPD, Chang *et al* establecieron una serie de intervalos para determinar la fiabilidad de los modelos PLS en función del mismo, estableciendo un umbral de RPD de 2.0 para considerar un buen modelo [118]. Sin embargo, otros autores, como Williams y Fearn, únicamente hablan de una buena capacidad predictiva para valores de RPD superiores a 5.0.

Aunque el RPD es muy utilizado para comparar la bondad de las calibraciones PLS, algunos autores consideran que la diferenciación de la calidad de los modelos en función de su valor de RPD es muy arbitraria, debido sobre todo a la falta de unanimidad para establecer la escala de valores de RPD. Por esta razón, autores como Bellon-Maurel *et al* proponen utilizar otro tipo de estadísticos, como es el caso de estadísticos basado en cuartiles [119,120]. A pesar de toda esta controversia, en esta Tesis se ha considerado adecuado tener en cuenta los valores de RPD como indicador de la capacidad predictiva de los modelos PLS construidos.

3.6.2 Comparación de los modelos PLS obtenidos con los métodos de referencia

Para comparar los modelos PLS establecidos con un método de referencia se analiza un tercer grupo de muestras (diferentes a las del set de calibración y el de validación), por ambos procedimientos y se aplica un test t de comparación de medias o un test t para datos emparejados, según proceda.

- Test t de comparación de medias cuando las desviaciones estándar son comparables

Para decidir si las varianzas correspondientes a dos situaciones distintas de poblaciones normales son significativamente diferentes se emplea el criterio F de Snedecor, que se calcula como la razón entre los cuadrados de las desviaciones estándar de los valores que se comparan siendo $F \geq 1$:

$$F_{cal} = \frac{S_1^2}{S_2^2}; \text{ siendo } S_1^2 \geq S_2^2 \text{ (Ecuación 16)}$$

El valor de F_{cal} se compara con el valor tabulado para un cierto nivel de confianza, generalmente 95 %, para n_1-1 y n_2-2 grados de libertad del numerador y denominador, respectivamente. Siendo n_i el número de muestras de cada serie.

Si el valor de F_{cal} es menor que el valor tabulado se puede afirmar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas. Si se quiere conocer si un método A es más preciso que un método B, se utilizará un ensayo de una cola. Si se quiere saber si ambos métodos tienen precisiones comparables se utiliza un ensayo de dos colas [80].

Para la comparación de las medias experimentales se toma como hipótesis nula que los dos métodos proporcionan el mismo resultado y que, por tanto, las diferencias entre ambas medias no difieren estadísticamente de cero. Si ambas muestras poseen desviaciones estándar que no son significativamente diferentes, se puede aplicar una estimación conjunta de la desviación estándar s a partir de s_1 y s_2 . Para calcular la hipótesis nula se calcula el estadístico t mediante la siguiente expresión.

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x}_1| - |\bar{x}_2|}{s_{dif}} = |\bar{x}_1| - |\bar{x}_2| \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{(n_1 + n_2) [(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2]}} \quad (\text{Ecuación 17})$$

El valor de t_{cal} se compara con el valor tabulado t_{tab} para $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad y un determinado nivel de confianza. Si t_{cal} es menor a t_{tab} , la diferencia entre las medias no difiere estadísticamente de cero y por tanto los valores obtenidos por ambos métodos de análisis son estadísticamente comparables para el nivel de confianza establecido.

- Test t de comparación de medias cuando las desviaciones estándar no son comparables

Para comparar dos medias experimentales cuando las desviaciones estándar difieren estadísticamente entre sí, se calcula el valor de t_{cal} a partir de la siguiente expresión:

$$t_{cal} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (\text{Ecuación 18})$$

Para el cálculo de los grados de libertad se utiliza la ecuación siguiente:

$$f = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}{\frac{1}{n_1+1} \left(\frac{s_1^2}{n}\right)^2 + \frac{1}{n_2+1} \left(\frac{s_2^2}{m}\right)^2} - 2 \quad (\text{Ecuación 19})$$

Si el valor de t_{cal} es menor que el tabulado para el número de grados de libertad calculado y el nivel de confianza establecido, se considera que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores y que son, por tanto, estadísticamente comparables.

- Test t para datos emparejados

En este caso se comparan parejas de valores para muestras analizadas mediante ambos procedimientos (modelo PLS y método de referencia). Se trata de comprobar si las diferencias entre los valores son estadísticamente significativas. Para probar la hipótesis nula se prueba si la media de la diferencia de los pares de valores \bar{d} , difiere significativamente de cero utilizando el estadístico t , que se calcula como:

$$t = \bar{d} \sqrt{n} / s_d \quad (\text{Ecuación 20})$$

donde n es igual al número de resultados emparejados, y s_d es la desviación estándar de las diferencias entre los pares de valores.

Comparamos el valor obtenido t_{cal} con el valor tabulado para un nivel de confianza dado y $n-1$ grados de libertad, de modo que si el valor calculado es

menor que el tabulado los valores obtenidos por ambos métodos no presentan diferencias estadísticamente significativas [80].

Los criterios para emplear uno u otro test están en función de los datos de referencia de los que se disponen.

El test t de comparación de medias se usó cuando:

- Se disponía de varias medidas de un mismo lote o partida, como por ejemplo en el caso de la cocaína compactada (ladrillos de cocaína).
- Se disponía de varias medidas para una misma muestra tanto por el método de prueba como por el de referencia.

El test para datos emparejados se usó cuando:

- Se compararon muestras de diferentes lotes o partidas.
- Sólo se dispuso de una medida como valor de referencia para realizar la comparación.

4

Resultados y discusión

En esta sección de la Tesis Doctoral se resumen los métodos puestos a punto para la determinación de cocaína en muestras decomisadas de diferente naturaleza.

4.1 Determinación de cocaína en muestras sólidas por medida directa DR-NIR en viales de vidrio

Este trabajo se publicó en la revista *Forensic Science International* bajo el título: *A green method for the determination of cocaine in illicit samples* [1].

4.1.1 Espectros NIR obtenidos

En la **Figura 45** se indican los espectros de un estándar de cocaína clorhidrato y compuestos relacionados con ésta como son la ecgonina, benzoilecgonina y ecgonina metiléster. Dichos compuestos presentan espectros NIR similares a la cocaína aunque con bandas características que permiten diferenciarlos entre sí.

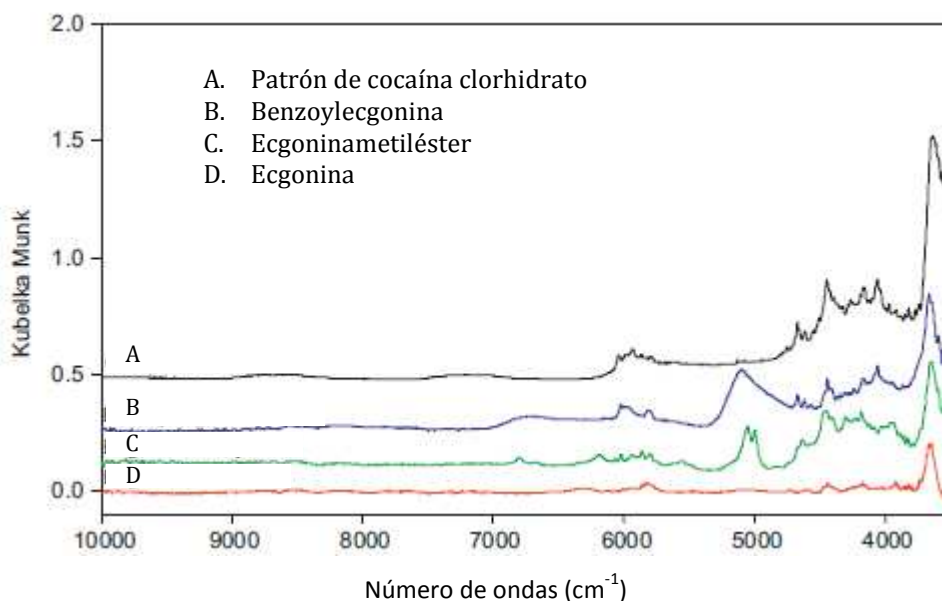


Figura 45. Espectros NIR de la cocaína y diferentes compuestos relacionados.

Las bandas que aparecen en el espectro se deben a sobretonos y a bandas de combinación y normalmente no pueden interpretarse por asignación directa [121]. Sin embargo, es posible identificar las bandas correspondientes a los grupos funcionales de la molécula en los compuestos puros. En la **Tabla 16** se indica la asignación de las bandas del espectro NIR de la cocaína y como puede comprobarse, las bandas más intensas que aparecen a 4065 cm^{-1} y a 4450 cm^{-1} corresponderían a la banda de combinación de los estiramientos C-H y C-C en el primer caso y a la combinación del estiramiento N-H y la deformación del grupo $-\text{NH}_3^+$ en el segundo, mientras que la banda que aparece sobre 5934 cm^{-1} correspondería al primer sobretono del estiramiento C-H.

Tabla 16. Asignación de las principales bandas del espectro NIR de cocaína.

cm^{-1}	nm	Vibración	Estructura
8752	1143	Segundo sobretono de estiramiento C-H	Aromática
8647	1156	Segundo sobretono de estiramiento C-H	-CH ₃
8518	1174	Segundo sobretono de estiramiento C-H	-CH=CH-
7350	1361	C-H estiramiento + deformación C-H	-CH ₃
7212	1387	C-H estiramiento + deformación C-H	-CH ₂ -
5934	1685	Primer sobretono de estiramiento C-H	Aromático
5868	1704	Primer sobretono de estiramiento C-H	-CH ₃
5791	1727	Primer sobretono de estiramiento C-H	-CH ₂ -
5129	1950	Segundo sobretono de estiramiento C=O	-CO ₂ R
4753	2104	Combinación C-H	
4673	2140	Estiramiento =C-H + estiramiento C=C	-CH=CH-
4613	2168	Estiramiento asimétrico C-H + combinación de la deformación C-H	
4553	2196	Estiramiento asimétrico CH ₂ + estiramiento C=	-CH=CH-
4450	2247	Estiramiento N-H + deformación del grupo -NH ₃ ⁺	
4396	2275	Estiramiento C-H + deformación del grupo CH ₂	-CH ₃
4327	2311	Estiramientos C-H + deformación del grupo C-H	-CH ₂ -
4192	2385	Combinación de estiramientos C-H y C-C	
4065	2460	Combinación C-H o sobretono de estiramiento simétrico C-N-C Estiramientos C-H + combinación de estiramientos C-C	

En las **Figuras 46 y 47** se presentan los espectros de una serie de muestras de cocaína a granel y de dosis con diferentes sustancias de corte. Como se puede observar las principales bandas se encuentran entre 4000-4700 cm^{-1} con bandas adicionales sobre 6000 cm^{-1} . Cuando la cocaína está mezclada con adulterantes, a pesar del solapamiento de bandas que se produce en algunas zonas del espectro, por comparación con el patrón de cocaína se continúa diferenciando gran parte de las bandas características que se observan para el patrón.

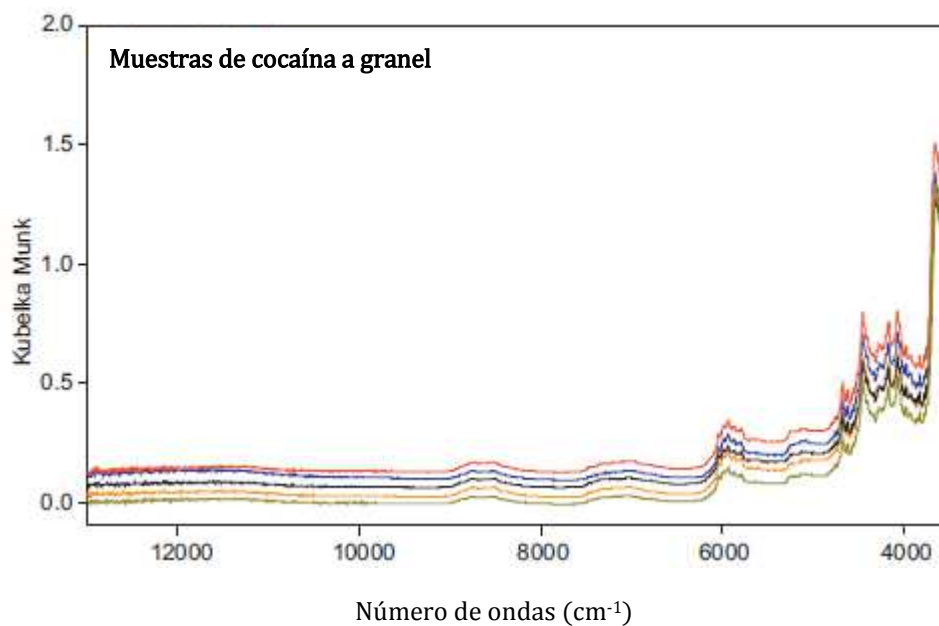


Figura 46. Espectros DR-NIR de diferentes muestras decomisadas de cocaína a granel.

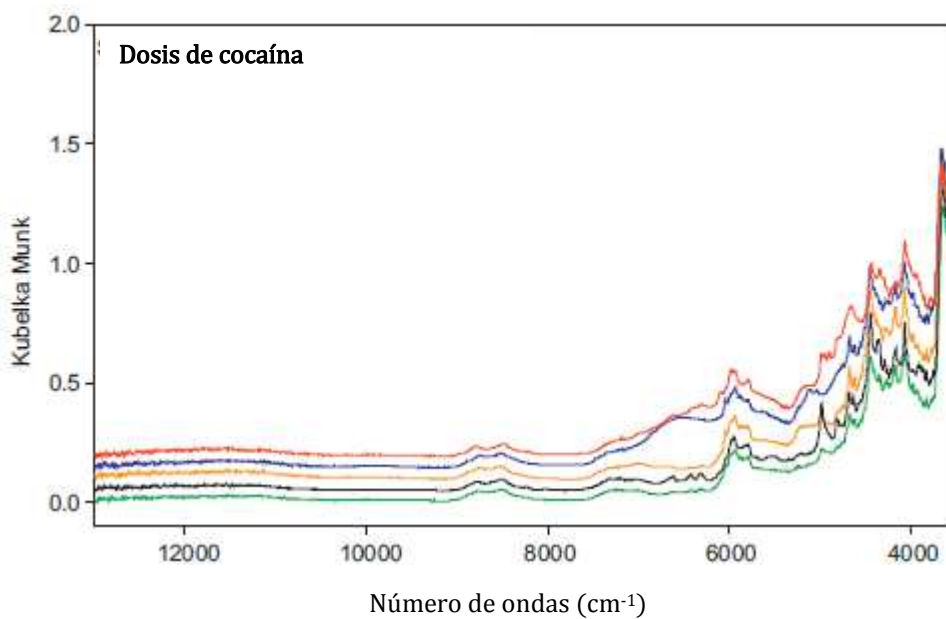


Figura 47. Espectros DR-NIR de muestras de dosis de cocaína que contienen diferentes sustancias de corte.

En la **Figura 48** se presentan los espectros de algunas de las sustancias adulterantes más comunes encontradas en las muestras de dosis incautadas durante el periodo 2009-2010. Como puede verse, presentan bandas de absorción en las mismas regiones que la cocaína, lo que supone la existencia de solapamientos espectrales que dificultarán la medida directa mediante calibración monovariante, pero también ofrecen información complementaria de tipo cualitativo sobre el proceso de corte y comercialización.

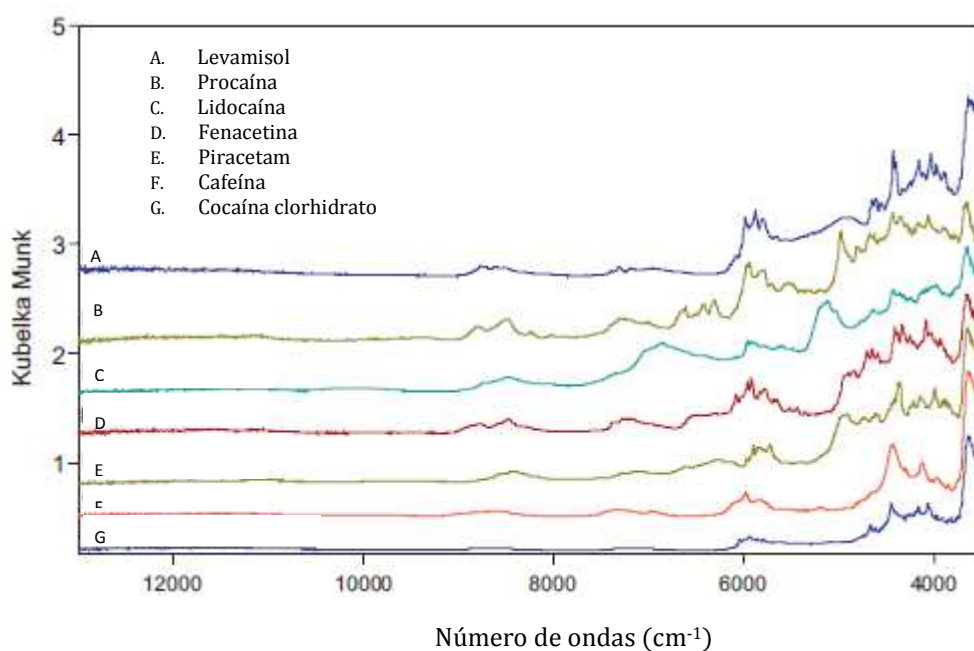


Figura 48. Espectros DR-NIR de los principales adulterantes presentes en las muestras de dosis de cocaína.

4.1.2 Análisis *cluster* de los espectros (HCA)

Un análisis exploratorio de los espectros correspondientes a todas las muestras consideradas en este estudio mediante un análisis *cluster* (HCA) permite establecer similitudes y diferencias entre las muestras. En este caso se utilizó el algoritmo de Ward y se consideró la distancia Euclídea tras seleccionar un intervalo de frecuencias y un determinado tratamiento previo de los espectros. Se seleccionaron intervalos espectrales de 6227-5899 y 5396-4833 cm^{-1} , que son las regiones del espectro NIR en las que aparecen las principales bandas de la cocaína. Como tratamiento previo se realizó una normalización vectorial. Como resultado se obtuvo el dendrograma de la **Figura 49**, en el que se observa que inicialmente se dividen las muestras en dos grupos que corresponden a las muestras a granel y a las dosis de cocaína, respectivamente. Esta separación pone de manifiesto las evidentes diferencias entre los espectros de ambos tipos de muestras y que este hecho debe ser considerado a la hora de establecer modelos de calibración que pretendan ser representativos y tener una elevada capacidad predictiva. En ese sentido la clasificación y los grupos observados se emplearon para la elección de los espectros a utilizar en la modelización posterior.

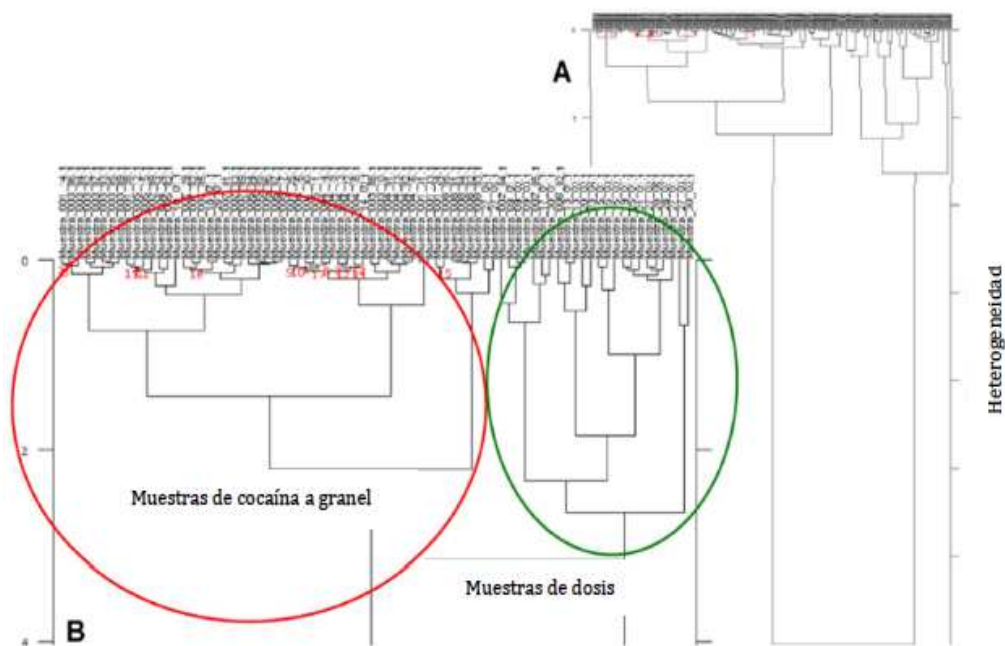


Figura 49. Dendrograma de los espectros DR-NIR de las muestras objeto de estudio. A. dendrograma completo. B. Detalle del dendrograma que evidencia la separación de los dos grupos de cocaína a granel y dosis. Condiciones: algoritmo de Ward considerando la distancia Euclídea y empleando la normalización vectorial de los datos espectrales correspondientes a las regiones de 6227-5899 y 5396-4833 cm^{-1} .

4.1.3 Construcción y evaluación de los modelos PLS-DR-NIR

Teniendo en cuenta las premisas anteriores, se construyeron diferentes modelos de regresión PLS para la determinación de cocaína, a saber:

- Un modelo que incluye todas las muestras (Modelo general)
- Otro con las muestras de cocaína a granel (Modelo granel)
- Un tercer modelo en el que se consideran sólo las dosis de cocaína (Modelo dosis)

Las muestras se asignaron al conjunto de calibración y validación teniendo en cuenta los criterios ya mencionados. Para el conjunto de calibración se seleccionó un número de muestras igual a la raíz cuadrada del número de

muestras de cada *cluster* y el resto de muestras se incluyeron en el conjunto de validación. Para los modelos General, Granel y Dosis se consideraron 15, 15 y 10 categorías respectivamente.

En la **Tabla 17** se recogen los estadísticos correspondientes a los diferentes conjuntos generados para cada una de las estrategias de modelización propuestas. En todo momento se ha tratado que la composición promedio de las muestras incluidas en los conjuntos de calibración y de validación fuera lo más parecida posible.

Tabla 17. Estadísticos correspondientes a los conjuntos de calibración y validación seleccionados para los diferentes modelos PLS generados.

Modelo	Número de muestras	Calibración		Número de muestras	Validación	
		Riqueza (cocaína base % p/p)			Riqueza (cocaína base % p/p)	
		Min-max	Media \pm s		Min-max	Media \pm s
General	34	11.38-86.44	56.5 \pm 20.4	44	17.53-85.60	65.0 \pm 15.6
Granel	28	52.09-86.40	72.0 \pm 8.90	26	55.23-80.68	71.0 \pm 5.6
Dosis	14	17.50-52.10	37.1 \pm 12.2	10	23.50-65.63	39.9 \pm 16.5

Para comprobar la correcta asignación de las muestras a cada uno de los conjuntos se realizó un estudio PCA. La detección de los *outlayers* se llevó a cabo empleando la información obtenida en el PCA. En la **Figura 50** se muestran los gráficos de *scores* del PCA para cada uno de los modelos generados y en ellos se aprecia que los conjuntos de calibración y validación están formados por muestras de composición similar que se encuentran distribuidas por igual.

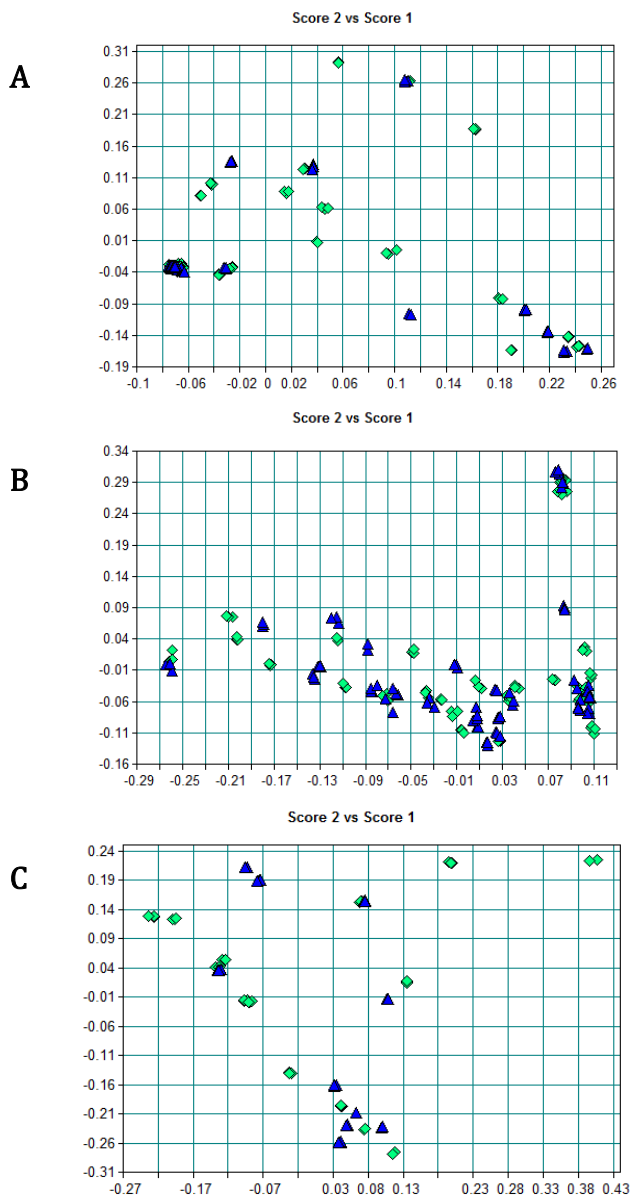


Figura 50. Representación gráfica de los *scores* PC₂ vs PC₁ para los modelos General (A), de muestras a Granel (B) y de muestras de Dosis de cocaína (C). Nota: ◆ muestras de calibración, ▲ muestras de validación.

Tal como se ha indicado, se construyeron los tres modelos PLS, estudiando las regiones espectrales, de manera que se seleccionaron aquellas donde aparecen las bandas de cocaína y se probaron combinaciones con otras regiones. Se probaron diferentes tipos de pre-tratamiento de los datos espectrales,

previamente centrados en la media, que proporcionaran los mejores resultados mediante una validación cruzada, seleccionando como número de factores aquel que proporcionara un menor valor del RMSECV. Trabajando sobre las regiones espectrales seleccionadas en la validación cruzada y probando con diferentes pre-tratamientos, se volvió a optimizar el método de manera que se obtuviera la mayor capacidad predictiva, es decir el menor RMSEP, para las muestras incluidas en el conjunto de validación. El número final de factores elegido es el que proporcionó el menor valor de RMSEP. Las características y los estadísticos de los modelos seleccionados se incluyen en el **Tabla 18**, en la que además de los errores de calibración, validación cruzada y predicción, se indican los valores de RPD para la predicción.

Tabla 18. Características de los tres modelos de calibración PLS finalmente seleccionados.

Parámetro	Modelo General	Modelo Granel	Modelo Dosis
Modo de medida	DR-NIR (medida directa en vial)	DR-NIR (medida directa en vial)	DR-NIR (medida directa en vial)
Muestras consideradas	Todas	Cocaína compactada (concentración > 50 % (p/p))	Muestras adulteradas
Regiones espectrales (cm⁻¹)	12500.7-10128.6 9339.8-6967.7 5388.3-4597.6	10981.1-7482.7 6784.5-5382.5 4684.4-3984.3	6101.8-5450.0
Pre-procesado	Primera derivada + Normalización vectorial	Primera derivada + Normalización vectorial	Normalización vectorial
Factores	8	6	7
RMSEC (% p/p)	2.52	2.17	1.45
RMSECV(% p/p)	3.52	2.96	1.54
RMSEP (% p/p)	4.02	3.52	3.12
RPD	3.92	1.59	5.36

Los resultados obtenidos para las muestras del conjunto de validación se indican en la **Tabla 19**, en la que se comparan con los obtenidos por el método de referencia cromatográfico.

Tabla 19. Determinación PLS-NIR de cocaína con los tres modelos de calibración considerados.

Muestra	Modelo/s utilizado/s	Valor de referencia cocaína (%p/p) cocaína (% p/p)referencia	Contenido de cocaína (% p/p)		
			General	Granel	Dosis
1	DOSIS	11.38			13.75±0.07
2	GENERAL	17.53	18.6±0.5		
3	DOSIS	23.50			20.3±0.1
4	GENERAL-DOSIS	29.58	28.2±0.04		28.0±0.1
5	GENERAL	32.35	28.6±0.5		
6	GENERAL-DOSIS	33.32	32.2±0.4		34.45±0.03
7	GENERAL	34.36	34.8±0.9		
8	DOSIS	36.53			29.59±0.03
9	DOSIS	37.09			38.96±0.08
10	GENERAL-DOSIS	48.42	48.3±0.9		48.6±0.3
11	GENERAL	49.50	44.4±0.6		
12	GENERAL-DOSIS	50.64	53.7±0.4		50.53±0.06
13	GENERAL	52.09	59.5±0.3		
14	GENERAL	53.42	61.6±0.4		
15	GENERAL-GRANEL	55.23	65.4±0.5	60.4±0.8	
16	GRANEL	62.99		67.7±0.1	
17	GENERAL-GRANEL	63.86	66.6±0.8	66.9±0.6	
18	GENERAL	64.23	61.6±0.7		
19	DOSIS	64.40			68.1±0.2
20	GENERAL	65.28	66.8±0.4		
21	GRANEL	65.46		64.6±0.7	
22	GENERAL-DOSIS	65.63	59.8±0.8		62.1±0.1
23	GENERAL	65.72	68.9±0.5		
24	GENERAL-GRANEL	65.73	63.7±0.5	62.1±0.4	
25	GRANEL	66.83		60.7±1.1	
26	GENERAL	67.20	71.7±0.8		
27	GRANEL	68.23		75.4±0.9	
28	GENERAL-GRANEL	68.25	72.3±0.2	71.5±0.8	
29	GRANEL	68.87		68.2±0.7	
30	GENERAL-GRANEL	69.79	72.0±1.2	71.8±0.3	
31	GENERAL	70.24	68.8±1.4		
32	GENERAL-GRANEL	70.31	68.5±0.6	67.5±0.8	
33	GENERAL	70.41	69.4±0.5		
34	GRANEL	70.55		67.1±0.5	
35	GENERAL-GRANEL	71.16	71.6±0.5	72.7±1.0	
36	GENERAL-GRANEL	71.18	68.1±1.1	71.0±0.4	
37	GENERAL-GRANEL	71.18	71.0±0.5	70.4±0.7	
38	GENERAL-GRANEL	72.04	70.5±0.4	72.2±0.7	
39	GRANEL	72.55		67.6±1.0	
40	GENERAL	72.62	71.2±0.7		
41	GENERAL-GRANEL	72.88	73.5±0.5	76.7±0.6	
42	GENERAL-GRANEL	73.15	69.0±0.6	71.5±2.4	
43	GRANEL	74.21		76.0±1.2	
44	GENERAL	74.32	74.6±0.7		
45	GENERAL	75.22	77.2±0.6		
46	GENERAL	75.29	73.6±0.3		
47	GENERAL-GRANEL	75.49	78.3±0.4	79.7±0.6	
48	GRANEL	76.00		77.9±0.4	
49	GENERAL	76.88	79.6±0.9		
50	GENERAL	76.95	76.2±0.7		
51	GENERAL	77.07	71.8±0.6		
52	GRANEL	77.60		71.1±0.8	
53	GENERAL	77.66	77.0±0.2		
54	GENERAL-GRANEL	78.28	79.7±0.6	78.1±1.9	
55	GENERAL	79.32	78.1±0.8		
56	GENERAL-GRANEL	80.52	78.9±0.2	82.0±0.4	
57	GENERAL	80.53	79.8±1.0		
58	GENERAL-GRANEL	80.68	78.5±0.9	81.7±0.8	
59	GENERAL	85.60	78.9±0.5		

Nota: Valor promedio para tres medidas acompañado de la desviación estándar.

Para cada muestra se ha indicado el modelo de calibración empleado y el resultado obtenido que corresponde al valor promedio de tres medidas (espectros) con su correspondiente desviación estándar. Como se puede observar la mayor precisión se obtuvo para los valores predichos con el Modelo Dosis, con un coeficiente de variación por debajo del 1 %. Le sigue el Modelo para las muestras a Granel con una precisión por debajo del 2 % y, por último, el Modelo General con valores que llegan al 3 % para las muestras con menores contenidos de cocaína. Por tanto se observa que al construir modelos separados para muestras diferentes, se mejora la capacidad predictiva del método y también mejora la precisión de los resultados obtenidos.

Respecto a la capacidad del método para determinar bajas concentraciones de cocaína, se ha hecho una estimación del límite de cuantificación (LOQ) a partir de la desviación estándar de la predicción de las muestras con menor cantidad de cocaína incluidas en el conjunto de validación. Considerando el criterio $LOQ = 10s$, siendo s la desviación estándar, se ha estimado un valor de 5 %, 8 % y 0.7 % (p/p) de cocaína base para el Modelo General, el correspondiente a las muestras a granel y el de las de dosis, respectivamente.

4.1.4 Validación del modelo PLS-DR-NIR

Para evaluar la capacidad predictiva de los modelos en términos de exactitud y precisión en la determinación de cocaína en muestras decomisadas, se analizaron por el método de referencia CG-FID y por PLS-DR-NIR un conjunto de 11 muestras de cocaína a granel, diferentes de las consideradas en el conjunto de calibración y en el de validación. Además, con objeto de determinar si el muestreo de las pastillas de cocaína compactada fue adecuado y cómo puede influir en los resultados obtenidos se determinó el grado de homogeneidad de una pastilla de cocaína compactada de 1 kg realizando un muestreo en 10 puntos diferentes de la misma, tomando medidas de porciones de la pastilla en superficie, en la parte interior y por el contorno de la misma.

Se obtuvo el HCA de los espectros para comprobar si existen diferencias en los mismos que permitan clasificar de forma adecuada las muestras como granel o dosis de cocaína. En la **Figura 51** puede verse el dendrograma con las muestras problema señaladas y en él se puede apreciar que todas las sub-muestras del kilogramo de cocaína quedan clasificadas en el conjunto de las muestras a granel y por tanto, el modelo que debe proporcionar mejores resultados para la cuantificación de la cocaína es el construido para las muestras a granel. Las muestras se analizaron también por el Modelo General pero no proporcionaron resultados comparables a los del método de referencia.

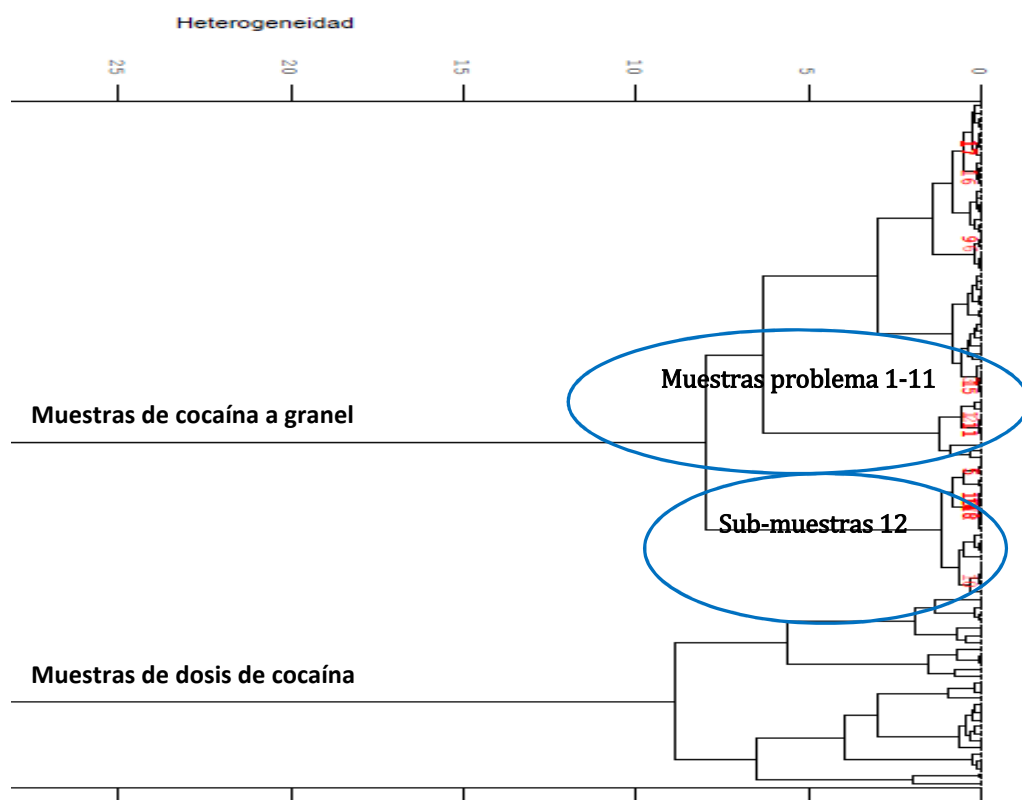


Figura 51. Dendrograma de las muestras de cocaína consideradas en la validación, con indicación de las que correspondiente a las sub-muestras tomadas de la pastilla de kilogramo de cocaína. Condiciones: algoritmo de Ward considerando la distancia Euclídea y empleando la normalización vectorial de los datos espectrales correspondientes a las regiones de 6227-5899 y 5396-4833 cm^{-1} .

La **Tabla 20** resume los resultados obtenidos para las nuevas muestras comparándolos con los obtenidos por el método de referencia.

Tabla 20. Resultados obtenidos para la validación del método PLS-DR-NIR empleando un nuevo conjunto de muestras y el Modelo Granel.

Muestras	% (p/p) cocaína base		
	Valor de referencia	Método PLS-DR-NIR propuesto	
	GC-MS	Modelo Granel	Diferencia
1	83.15	83.10	-0.05
2	82.86	81.74	-1.12
3	83.70	84.22	0.52
4	80.00	79.55	-0.45
5	84.18	83.27	-0.91
6	82.02	81.36	-0.66
7	77.99	77.95	-0.04
8	82.84	82.65	-0.19
9	82.94	83.27	0.33
10	82.94	82.98	0.04
11	82.65	82.52	-0.13
		Media $d \pm s$	-0.24 \pm 0.50
		<i>t_{cal}</i>	1.59
		<i>t_{tab}</i>	2.23
Sub-muestras			
12-1	61.71	61.95	
12-2	56.15	58.18	
12-3	58.60	55.60	
12-4	59.90	61.33	
12-5	59.50	58.66	
12-6	59.83	58.13	
12-7	60.66	59.20	
12-8	62.35	58.19	
12-9	60.22	58.78	
12-10	61.33	56.39	
Media $\pm s$	60.0\pm1.8	58.6\pm1.9	
	<i>t_{cal}</i>	1.69	
	<i>t_{tab}</i>	2.10	

En el caso de las once muestras de cocaína a granel, si se aplica un test t para datos emparejados, se ve que los resultados obtenidos por ambos métodos no presentan diferencias estadísticamente significativas.

En el caso de las muestras de diferentes puntos de la misma pastilla compactada de 1 kg, como se puede observar, los valores de desviación estándar obtenidos son comparables, lo que indica que ambos modelos tienen una precisión similar, siendo además la exactitud para los dos métodos estadísticamente comparable para un nivel de confianza del 95%.

En cuanto a la homogeneidad de la pastilla compactada, se ve que los valores obtenidos en los diferentes puntos de medida presentan entre sí un coeficiente de variación del 3%, tanto para el método GC-FID como para el modelo PLS-DR-NIR. Esto indica que la técnica PLS-DR-NIR puede utilizarse como una herramienta para estimar la homogeneidad de las muestras y que la pastilla puede considerarse homogénea en cuanto a su contenido de cocaína; Por tanto, no sería necesario tomar medidas en todos los puntos de la pastilla, siendo suficiente el muestreo en un par de puntos, ya que la desviación estándar correspondiente a la muestra es del orden de la precisión de las técnicas utilizadas.

En resumen, los resultados obtenidos muestran que el modelo PLS-DR-NIR proporciona un método sostenible, rápido, exacto y no destructivo para la determinación de cocaína en materiales incautados.

El uso del análisis *cluster* (HCA) basado en el espectro NIR constituye una herramienta para la correcta selección de los conjuntos de calibración y validación de los modelos y podría ser útil para clasificar las muestras incautadas en función de su naturaleza de acuerdo a su espectro NIR y seleccionar el modelo más apropiado para determinar su contenido en cocaína.

El modelo PLS-DR-NIR comparado con el método de referencia proporciona resultados con una adecuada exactitud y precisión y ventajas añadidas, como son que no requiere del uso de disolventes ni de productos químicos, la preparación de la muestra es mínima y que se basa en medidas rápidas y no

destructivas. La metodología propuesta podría utilizarse en el análisis *in situ* utilizando para ello equipos portátiles y permitiría obtener evidencias científicas de las muestras sin recurrir a su destrucción, evitando así riesgos para el operador y el medio ambiente.

Para mejorar la capacidad predictiva de los modelos PLS-DR-NIR sería necesario evaluar el efecto de la naturaleza y concentración de los diferentes adulterantes que acompañan a las muestras de cocaína. En la siguiente sección se presenta un estudio empleando otra variante de la espectroscopia infrarroja, sobre los adulterantes que pueden encontrarse en las muestras de cocaína incautadas y que constituyen la base de este nuevo trabajo.

4.2 Determinación de cocaína y sus adulterantes por ATR-MIR

En esta sección se resumen dos estudios realizados sobre muestras de cocaína en polvo incautadas. En ambos estudios se empleó la técnica ATR-MIR; en el primero para desarrollar un método cualitativo para la confirmación de adulterantes en las muestras y en el segundo para determinar el porcentaje de cocaína en las mismas.

4.2.1 Presencia de adulterantes en muestras de cocaína decomisadas en Valencia

Para conocer la realidad del problema de las sustancias adulterantes en la comercialización de cocaína se realizó un estudio por GC-MS sobre un total de 568 muestras de dosis y 100 muestras de cocaína a granel. Las muestras fueron incautadas durante 2015-2016 en las provincias de Valencia y Castellón. Con objeto de establecer los adulterantes más comunes para este conjunto de muestras de cocaína se obtuvieron los cromatogramas de las muestras disueltas en etanol y se compararon los espectros de masas de los picos encontrados con diferentes bibliotecas de espectros. A continuación, a modo de ejemplo se presenta el cromatograma de una muestra de dosis en la que se ha detectó la presencia de tres sustancias adulterantes: cafeína, levamisol y tetracaína (**Figura 52**).

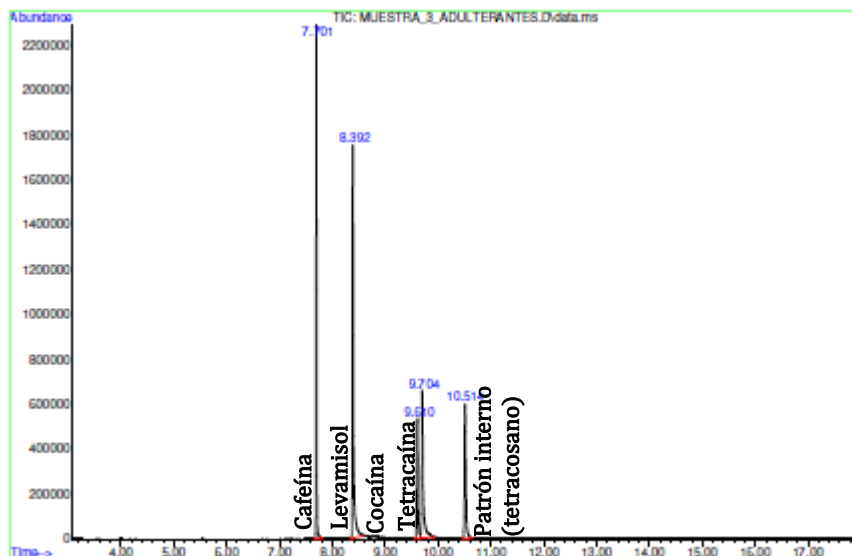
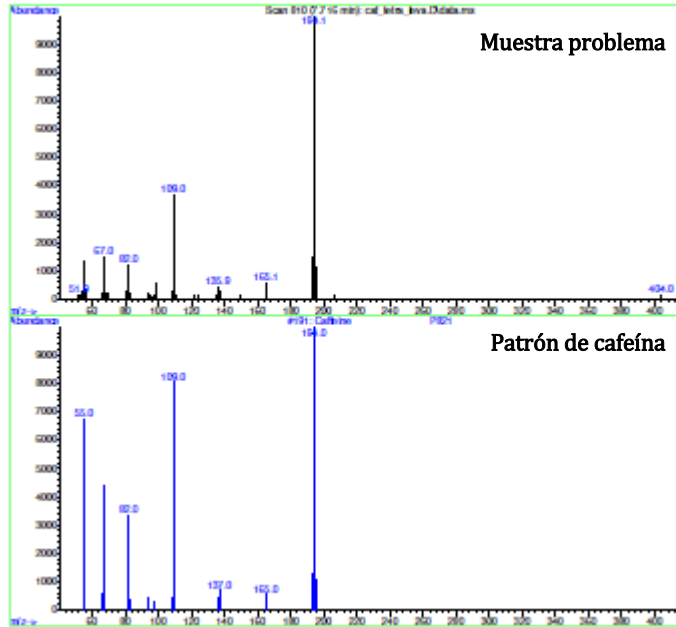


Figura 52. Cromatogramas de una muestra de dosis de cocaína en la que se detecta la presencia de sustancias adulterantes.

Los espectros de masas de los picos cromatográficos se compararon con los de las referencias de las bases de datos utilizadas (Wiley, Tox 3 y SWGDRUG), ya descritas en la Parte Experimental, por lo que se estableció una correcta identificación de los mismos. En la **Figura 53** se indican, a modo de ejemplo, la comparación de los espectros de masas en los casos de la identificación de cafeína (**Figura 53 A**) y tetracaína (**Figura 53 B**) en las muestras adulteradas.

A



B

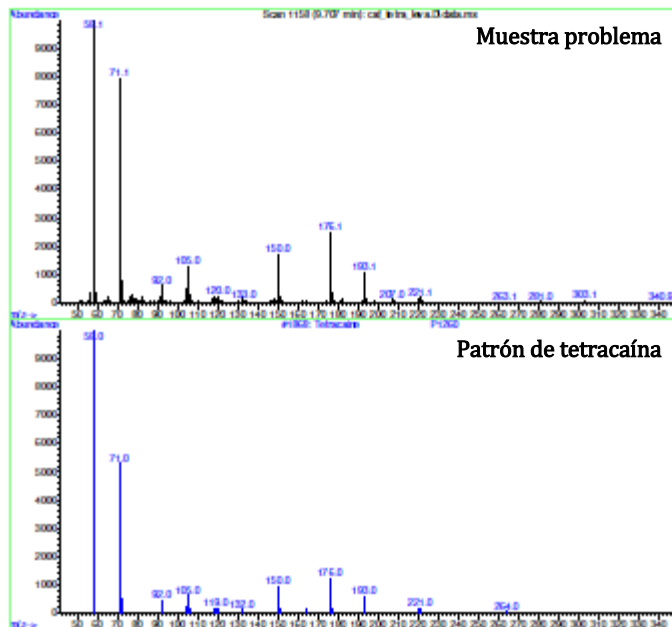


Figura 53. Comparación de los espectros de masas obtenidos para la muestra problema con los de la base de datos. A. Sustancia identificada como cafeína. B. Sustancia identificada como tetrahydrocannabinol.

Un estudio detallado de los resultados obtenidos para estas muestras pone de manifiesto que en el caso de las 100 muestras de cocaína a granel se detectó levamisol en un 80 % de las mismas, en un 12 % se confirma la presencia de fenacetina y el 8 % restante, aparentemente, no contenía sustancias adulterantes. Estos resultados son compatibles con los encontrados en la bibliografía, que estiman que en la actualidad el 70 % de toda la cocaína a nivel mundial presenta como adulterante el levamisol [15].

En las 568 muestras de dosis de cocaína se detectó la presencia, bien en forma individual o combinada, de hasta diez adulterantes distintos, siendo los mayoritarios el levamisol, la cafeína y la fenacetina, que se detectaron en un 73, 35 y 31 % de las muestras, respectivamente. Con porcentajes de presencia ligeramente superiores al 10 % se encontró tetracaína, lidocaína y procaína, mientras que el piracetam, el paracetamol, el ibuprofeno y la benzocaína ya se encontraron en un porcentaje mucho menor de las muestras. En la **Tabla 21** se detallan los resultados obtenidos para el análisis cualitativo por GC-MS del conjunto de las muestras de dosis consideradas en este estudio.

Tabla 21. Presencia de los adulterantes detectados en el estudio de 568 muestras de dosis de cocaína incautadas durante los años 2015 y 2016.

Adulterante detectado	Porcentaje (%)
1 Levamisol	73 %
2 Cafeína	35 %
3 Fenacetina	31 %
4 Tetracaína	13 %
5 Lidocaína	12 %
6 Procaína	11 %
7 Piracetam	3.0 %
8 Paracetamol	2.0 %
9 Ibuprofeno	1.0 %
10 Benzocaína	0.3 %

Si se clasifican los adulterantes encontrados en función de su actividad farmacológica se puede hablar de cuatro anestésicos locales (tetracaína, lidocaína, procaína y benzocaína), tres analgésicos (fenacetina, paracetamol e ibuprofeno), un estimulante del sistema nervioso (cafeína), un vasodilatador periférico (piracetam) y un antihelmíntico (levamisol).

Cabe destacar que el porcentaje de muestras en las que se detectó la presencia de levamisol es muy superior a aquellas donde se detectó cafeína y fenacetina. Esto podría deberse a que la cocaína a granel, procedente del tráfico internacional, y a partir de la cual se elaboran las dosis, ya viene adulterada, en un 80% de los casos analizados, con levamisol y esto justificaría su presencia en las dosis. Los adulterantes con menor presencia son piracetam, paracetamol, ibuprofeno y benzocaína, de manera que se puede considerar su uso como anecdótico y no significativo de lo que supone el proceso habitual de manipulación y corte esta droga para su comercialización.

De los resultados de este estudio se ha podido comprobar que la mayor parte de las muestras de dosis adulteradas (43 %) presentan un único adulterante, a continuación y de forma decreciente siguen las muestras en las que están presentes dos, tres, cuatro y cinco adulterantes. Es de destacar que, tal como se indica en la **Tabla 22** en un 13 % de las muestras no se ha detectado la presencia de estos adulterantes.

Tabla 22. Distribución de los adulterantes encontrados en las 568 muestras de dosis de cocaína.

<u>Nº de adulterantes</u>	<u>Porcentaje (%)</u>
0	13 %
1	43 %
2	19 %
3	16 %
4	9 %
5	1 %

De las muestras de dosis de cocaína en las que se detectó un solo adulterante (43 %) el 86 % de las mismas corresponde a la presencia de levamisol, el 11 % contienen fenacetina, seguida de cafeína con un 2 % y paracetamol que tan solo representa del orden de un 1 %.

De las muestras en las que se detectó la presencia de dos adulterantes (19 %), se encontraron 11 combinaciones. Las más frecuentes fueron, en primer lugar, las mezclas binarias que incluyen levamisol, cafeína y fenacetina, seguidas por la combinación de uno de estos tres adulterantes con un anestésico local (procaína, tetracaína o lidocaína). En la **Tabla 23** se puede ver el porcentaje para cada una de las once combinaciones de dos adulterantes encontradas. Como se puede observar el levamisol aparece en seis de ellas, siendo el adulterante mayoritario.

Tabla 23. Distribución de la presencia de adulterantes en las muestras de dosis para cada una de las combinaciones de dos adulterantes.

<u>Combinación</u>	<u>Adulterantes</u>	<u>Porcentaje (%)</u>
1	Cafeína/Levamisol	26
2	Fenacetina/Levamisol	19
3	Cafeína/ Fenacetina/	14
4	Levamisol/Procaína	11
5	Levamisol/Lidocaína	9
6	Cafeína/Lidocaína	8
7	Cafeína/Procaína	4
8	Levamisol/Tetracaína	4
9	Fenacetina/Procaína	2
10	Cafeína/Tetracaína	2
11	Levamisol/Piracetam	1

En las muestras en las que se detectó tres adulterantes (16 % del total), se encontraron 14 combinaciones de los mismos. La más frecuente fue levamisol con cafeína y tetracaína, que se ha detectó en un 30 % de las mismas, seguida de levamisol con cafeína y fenacetina en un 15 % y de la mezcla de levamisol, cafeína y lidocaína en un 10 %, lo que indica que el tándem cafeína/levamisol

más un tercer componente, es el más habitual en el entorno de Valencia. Otras combinaciones, tal como puede verse en la **Tabla 24**, aparecen con menor frecuencia. Cabe destacar que la cafeína está presente en once de las catorce combinaciones, siendo el adulterante más prevalente en las mezclas de tres sustancias. El segundo es el levamisol que está presente en ocho de las catorce combinaciones encontradas, seguido de la fenacetina que está presente en seis de las catorce combinaciones.

Tabla 24. Distribución de las frecuencias de adición de adulterantes en muestras de dosis para cada una de las combinaciones de tres sustancias.

<u>Combinación</u>	<u>Adulterantes</u>	<u>Porcentaje (%)</u>
1	Cafeína/Levamisol/Tetracaína	30
2	Cafeína/Fenacetina/Levamisol	15
3	Cafeína/Lidocaína/Levamisol	10
4	Cafeína/Fenacetina/Piracetam	8
5	Cafeína/ Levamisol /Procaína	6
6	Cafeína/Fenacetina/Tetracaína	6
7	Cafeína/Levamisol/Piracetam	4
8	Cafeína/Fenacetina/Procaína	2
9	Cafeína/Fenacetina/Lidocaína	2
10	Fenacetina/Levamisol/Procaína	2
11	Cafeína/ Procaína/Tetracaina	2
12	Fenacetina/Lidocaina/Procaina	1
13	Fenacetina/Ibuprofeno/Levamisol	1
14	Benzocaína /Cafeina/Levamisol/	1

Las combinaciones de cuatro adulterantes, se han detectado en el 9 % de las muestras de dosis, siendo la combinación que con más frecuencia aparece la constituida por cafeína, levamisol, fenacetina y tetracaína, en el 46 % de las mismas. En la **Tabla 25** se puede ver la distribución de las ocho combinaciones encontradas para estas muestras. En las tres combinaciones más frecuentes, que suman un 74% del total, están presentes simultáneamente la cafeína, la fenacetina y el levamisol. Siendo la cafeína el adulterante más frecuente, ya que está presente en siete de las ocho combinaciones.

Tabla 25. Porcentaje de muestras en las que están presentes diferentes combinaciones de cuatro adulterantes encontradas en las muestras de dosis en las que se detecta cuatro componentes además de cocaína.

<u>Combinación</u>	<u>Adulterantes</u>	<u>Porcentaje(%)</u>
1	Cafeína/Fenacetina/Levamisol/Tetracaína	46
2	Cafeína/Fenacetina/Levamisol/Procaína	16
3	Cafeína/Fenacetina/Levamisol/Lidocaína	12
4	Cafeína/Levamisol/Paracetamol/Procaína	8
5	Cafeína/Lidocaína/Paracetamol/Procaína	8
6	Cafeína/Fenacetina/Procaína/Tetracaína	4
7	Fenacetina/Levamisol/Lidocaína/Procaína	4
8	Cafeína/Fenacetina/Lidocaína/Tetracaína	2

Las combinaciones de cinco adulterantes no se han tenido en cuenta, ya que solo representan el 1 % del total de muestras de dosis estudiadas y, en ese sentido, su presencia se considera como anecdótica.

4.2.2. Método ATR-MIR para la determinación de cocaína y sus adulterantes más comunes en muestras decomisadas

4.2.2.1 Espectro ATR-MIR de la cocaína

La espectroscopia infrarroja en la región entre 4000 y 400 cm^{-1} con transformada de Fourier (FT-IR) se utiliza habitualmente en los laboratorios forenses para la identificación de sustancias controladas. En el caso de las aminas terciarias como la cocaína, las bandas características de absorción provienen normalmente del anillo aromático y no necesariamente del grupo funcional amina.

En la **Figura 54** se representan los espectros ATR-MIR de la cocaína base y de la forma clorhidrato. Ambos espectros presentan bandas típicas de importante intensidad en la región de baja frecuencia de 600-900 cm^{-1} , que son el resultado de flexiones fuera de plano de los enlaces aromáticos C-H. Las bandas de 1585 a 1600 cm^{-1} son el resultado de las vibraciones de esqueleto de

los anillos aromáticos que implican la existencia de enlaces C=C conjugados (alternan enlaces individuales y dobles enlaces). En la región de 1400 a 1500 cm^{-1} , se observan otras bandas importantes que son el resultado de vibraciones similares en el anillo aromático. Entre 3000 y 3100 cm^{-1} aparecen bandas características de estiramiento de los enlaces C-H en moléculas aromáticas. Por su parte, la cocaína en su forma de sal presenta una banda típica ancha en la región de 2400-2700 cm^{-1} , que es especialmente útil para diferenciar la cocaína clorhidrato (sal) de la base libre, tal como puede apreciarse en la mencionada figura. Además, sobre 1250-1300 cm^{-1} se observan bandas características de estiramiento de los enlaces C-N en aminas terciarias aromáticas y, aunque estas bandas pueden ser difíciles de aislar de las adyacentes en muchas de las aminas terciarias, normalmente suelen distinguirse bastante bien en el caso de la molécula de cocaína [85]. Por lo que respecta al espectro de la forma clorhidrato (**Figura 54 B**), que es con la que habitualmente se encuentra en los materiales decomisados, las principales bandas, que aparecen en la región de 1712 a 1728 cm^{-1} , corresponden a vibraciones de estiramiento de los dos grupos carbonilo; a 1265 cm^{-1} , 1230 y 1105 cm^{-1} aparecen bandas debidas a estiramientos del enlace C-O del grupo acetato; a 1071 cm^{-1} , 1025 y 729 cm^{-1} vibraciones de estiramiento y vibraciones fuera de plano de los enlaces del benceno mono sustituido. Además de las indicadas, se observa una banda característica alrededor de 2535 cm^{-1} que corresponde a vibraciones de estiramiento de los enlaces N-H debidos a la formación de la sal de clorhidrato [85].

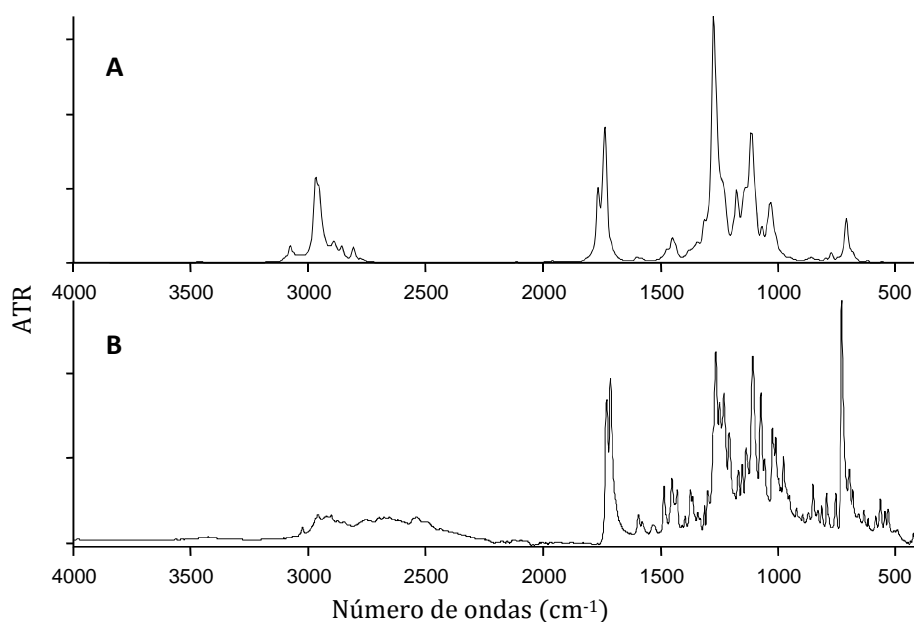


Figura 53. Espectros ATR-MIR. A. Cocaína base. B. Cocaína clorhidrato.

Por tanto, la espectroscopia en el infrarrojo medio es una técnica muy interesante para el estudio de muestras que contengan cocaína, no solo con el fin de identificar su presencia y poder realizar una cuantificación de la misma, sino también para estudiar las sustancias de corte que la acompañen, especialmente en el caso de incautación de dosis; y de esta manera obtener un mayor nivel de información acerca de las muestras que permita su correcta caracterización tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo. Por este motivo, en esta sección se resumen los resultados obtenidos en el desarrollo de un método para la identificación de adulterantes presentes en muestras de cocaína a partir de la comparación de los espectros ATR-MIR con los de una base de datos creada a tal efecto, así como la puesta a punto de un método PLS para la determinación cuantitativa de cocaína en muestras decomisadas.

La existencia de espectros IR característicos para las sustancias de corte o adulterantes permite llevar a cabo una identificación de las mismas y plantear el análisis cualitativo de muestras que contengan cocaína y alguno de los adulterantes comentados anteriormente. Tal como se ha explicado en la Parte Experimental, para estudiar la posible identificación de los diferentes adulterantes presentes en las muestras se ha establecido una estrategia basada en dos pasos: 1) comparación del espectro problema con una biblioteca de espectros y 2) confirmación de la presencia de los adulterantes mediante la aplicación de un test de conformidad. Este estudio se ha centrado en los seis adulterantes que con más frecuencia se han detectado en las muestras estudiadas. En la **Figura 55** puede verse la comparación de los espectros ATR-MIR característicos de estas seis sustancias y de un patrón de cocaína clorhidrato. En dicha figura se aprecia que las bandas de cocaína se solapan con las bandas características de la mayoría de los adulterantes en la región de 600 a 1800 cm^{-1} . Es por ello que para la comparación de los espectros se opta por crear una biblioteca utilizando toda la región espectral y no limitarla a la región de la huella dactilar.

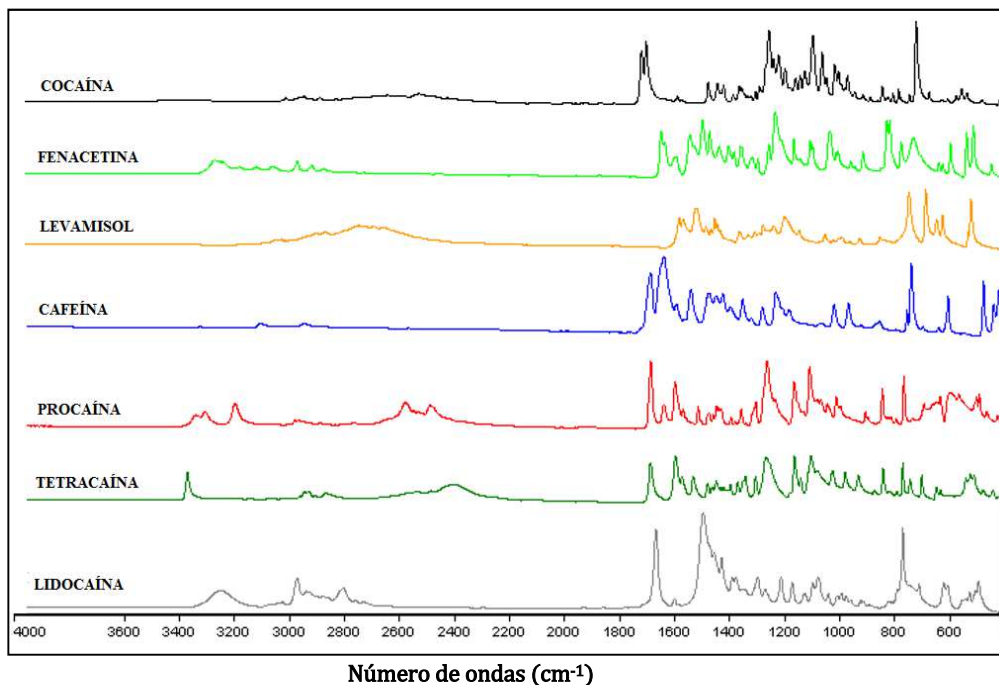


Figura 55. Espectros ATR-MIR de los seis adulterantes estudiados y de patrón de cocaína clorhidrato.

Con ayuda del *software* OPUS 6.5 de Bruker se creó una biblioteca, utilizando como espectros de referencia los correspondientes a muestras de cocaína cortadas con cada una de las combinaciones de adulterantes encontradas, muestras sin adulterar y un patrón de cocaína clorhidrato. La opción búsqueda de espectros (*spectrum search*) del programa permite comparar espectros desconocidos con los existentes en la biblioteca. En este caso, como ya se ha comentado, la comparación se realizó utilizando todo el rango espectral de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹ y se empleó el algoritmo de búsqueda estándar.

En la **Figura 56** se pueden ver, a modo de ejemplo, los espectros de tres de las mezclas más comunes encontradas en las muestras de cocaína adulterada; éstas son cocaína adulterada con levamisol, cocaína adulterada con levamisol y cafeína, y cocaína adulterada con levamisol, cafeína y tetracaína. En los espectros aparecen señaladas algunas bandas características de los

adulterantes, de manera que es posible diferenciarlos y detectar su presencia en las muestras de cocaína incautada.

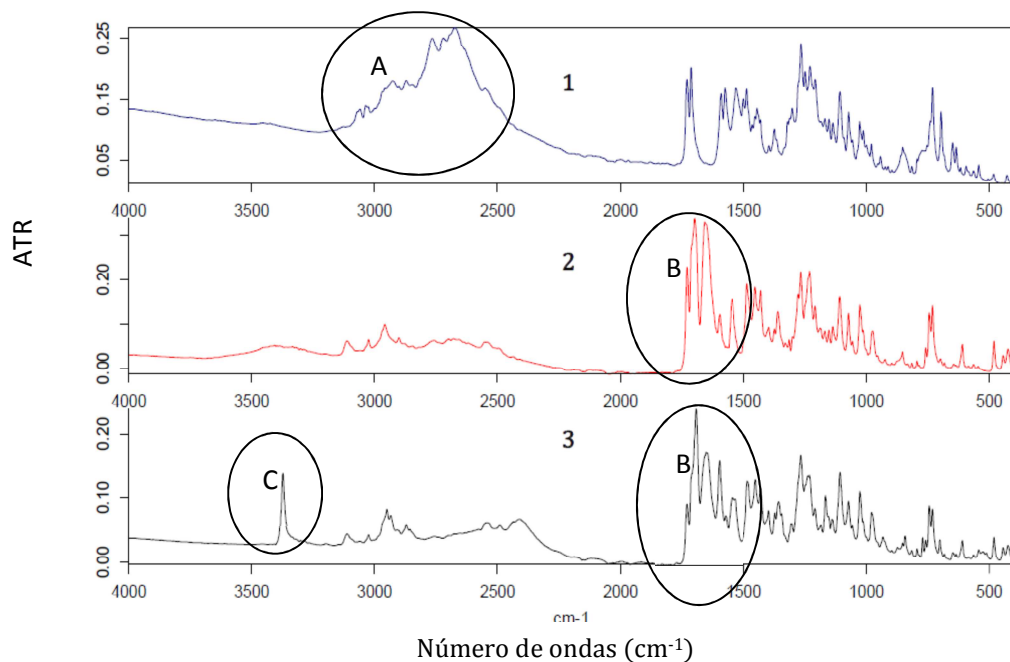


Figura 56. Espectros ATR-MIR de las combinaciones más comunes de cocaína con 1, 2 y tres adulterantes con la cocaína: 1. cocaína y levamisol; 2. cocaína con levamisol y cafeína; 3. cocaína con levamisol, cafeína y tetracaína. Nota: Se señalan las regiones correspondientes a las bandas consideradas para el levamisol (A), la cafeína (B) y la tetracaína (C).

El estudio de las bandas características del espectro de cada uno de los adulterantes permitió configurar métodos de conformidad para la identificación específica de cada uno de ellos que, tal como se ha comentado, constituye la segunda etapa del procedimiento de identificación que se propone en esta Tesis Doctoral para el estudio y clasificación rápida las muestras adulteradas. El objetivo de los métodos de conformidad establecidos es aumentar la especificidad y selectividad del método cualitativo.

Para el test de conformidad se han empleado espectros obtenidos de los adulterantes aislados y de mezclas con cocaína en diferentes proporciones, que han sido preparadas en el laboratorio.

En la **Tabla 26** se puede ver el intervalo de la composición de las muestras utilizadas en cada test de conformidad. Como se puede apreciar, en el test de la procaína se han tenido que emplear mezclas con todos los adulterantes estudiados para establecer un método con una adecuada especificidad y selectividad. En el resto de los casos ha sido suficiente emplear mezclas de cada adulterante con la cocaína en diferente proporción.

Tabla 26. Composición de las mezclas utilizadas en los test de conformidad

Test de conformidad (Sustancia)	Cocaína base (intervalo en % p/p)	Adulterantes empleados
Levamisol	3.9 % - 51.0 %	Levamisol
Cafeína	1.1 % - 43.0 %	Cafeína
Fenacetina	22.6 % - 53.2 %	Fenacetina
Tetracaína	5.1 % - 65.9 %	Tetracaína
Procaína	4.3 % - 75.8 %	Procaína, lidocaína, levamisol, cafeína, fenacetina, tetracaína.
Lidocaína	4.2 % - 46.4 %	Lidocaína

En la **Tabla 27** se indican los parámetros de los tests de conformidad establecidos para cada uno de los seis componentes objeto de estudio. Para ello se han seleccionado las bandas características de cada uno de los adulterantes para los que se ha creado el test y, a partir de ahí, se ha ido acotando la región espectral de trabajo y buscando un pre-tratamiento de los espectros que dé lugar a un método con la mayor especificidad y selectividad.

Tabla 27. Parámetros de los test de conformidad de los adulterantes estudiados.

<u>Adulterante</u>	<u>Pre-procesado</u>	<u>Rango espectral (cm⁻¹)</u>
		3431-3182
		2600-2364
Levamisol	Primera derivada	1646-1322
		1200- 800
		605-400
Cafeína	Primera derivada + Normalización vectorial	1844-400
Fenacetina	Primera derivada	3400-2400
Tetracaína	Normalización vectorial	3343-3400
Lidocaína	Primera derivada	2978-2482
Procaína	Primera derivada	2935-2636

El modelo cualitativo se ha validado con 50 nuevas muestras de prueba. En la **Tabla 28** se resumen las características de dichas muestras teniendo en cuenta que la identificación del adulterante se ha realizado por GC-MS y la cuantificación del mismo por el método de referencia basado en GC-FID.

Tabla 28. Composición de las muestras utilizadas en la validación del método cualitativo de identificación mediante ATR-MIR. Nota: los contenidos están expresados en % (p/p).

CONTENIDOS DETERMINADOS POR CG-FID							
Muestra	Cocaína	Levamisol	Cafeína	Fenacetina	Tetracaína	Procaína	Lidocaína
1	81.4	-	-	-	-	-	-
2	70.1	8.3	-	-	-	-	-
3	63.2	17.8	-	-	-	-	-
4	64.1	10.5	-	-	-	-	-
5	53.1	-	-	-	-	-	-
6	22.8	2.6	8.3	11.2	-	-	18.0
7	20.3	12.5	16.3	21.3	-	-	21.0
8	1.0	-	18.1	-	1.9	57.2	-
9	61.9	14.9	-	-	-	-	-
10	73.4	10.2	-	-	-	-	-
11	27.5	9.7	-	-	-	-	-
12	25.6	10.4	37.0	-	-	-	-
13	82.4	-	-	-	-	-	-
14	80.9	-	-	-	-	-	-
15	39.7	-	2.6	42.7	7.	-	-
16	82.0	7.0	-	-	-	-	-
17	71.1	13.0	-	-	-	-	-
18	73.1	8.8	-	-	-	-	-
19	70.2	9.5	-	-	-	-	-
20	78.2	-	-	-	-	-	-
21	25.4	7.2	25.2	-	-	-	5.4
22	60.9	16.0	-	-	-	-	-
23	39.4	9.6	40.8	-	-	-	-
24	25.5	31.5	-	38.7	-	-	-
25	52.3	10.6	21.8	-	-	-	-
26	28.3	6.5	31.8	-	13.5	-	-
27	36.1	-	19.1	-	-	-	-
28	28.5	-	36.2	-	-	-	-
29	69.1	10.1	-	-	-	-	-
30	61.3	8.4	-	-	-	-	-
31	68.8	5.3	-	-	-	-	-
32	36.0	-	-	54.8	-	-	-
33	41.2	-	-	40.2	-	-	-
34	39.7	-	-	49.5	-	-	-
35	28.5	-	26.4	39.7	-	-	-
36	11.2	8.3	26.2	56.0	-	-	-
37	17.2	-	18.2	18.7	-	-	47.8
38	48.1	17.8	25.1	-	-	-	-
39	23.4	26.9	34.8	-	-	-	-
40	27.6	23.2	40.1	-	-	-	-
41	33.1	13.4	-	44.7	-	-	-
42	38.7	24.1	-	28.1	-	-	-
43	43.2	0.9	19.2	22.8	-	-	-
44	35.5	1.5	25.1	26.4	-	-	-
45	6.9	9.1	25.2	-	17.5	-	-
46	6.3	14.1	22.8	-	12.8	-	-
47	32.5	-	15.7	29.9	-	-	-
48	35.5	-	18.4	35.7	-	-	-
49	22.2	-	-	19.4	-	21.4	37.9
50	28.3	-	15.6	-	-	50.8	-

Los espectros de las muestras utilizadas en la validación se compararon con los de la biblioteca y posteriormente se utilizó el método de conformidad para confirmar la presencia de los adulterantes. En las **Tablas 29.1 y 29.2** se pueden ver los resultados obtenidos para estas muestras aplicando el método propuesto en dos etapas: 1) se realiza la comparación con la biblioteca y se consideran los dos resultados con un mayor nivel de correlación (*hit*) que se representa en la tabla bajo la consideración de “Resultado de la biblioteca”. 2) en la segunda, a partir de los resultados de la biblioteca se aplica el test de conformidad para confirmar o descartar la presencia de los adulterantes supuestamente presentes según la comparación con la biblioteca. En el caso de que en la primera opción no se detecten adulterantes, el test de conformidad se aplica para descartar la presencia de cualquiera de los seis adulterantes estudiados. Estos últimos se representan en la tabla como “Resultados del test de conformidad” y en ellos los signos S y N hacen referencia a la presencia (S) o ausencia (N) del adulterante en la muestra según los resultados obtenidos por el método de referencia GC-MS. Las celdas que aparecen sombreadas corresponden a los aciertos producidos, esto es, que el resultado de presencia o ausencia del adulterante que se obtiene con el test de comparación corresponde con la composición real de la muestra. Las casillas aparecen en blanco cuando no procede aplicar el test de conformidad por no haber aparecido ese adulterante en los resultados de comparación con la biblioteca. Tal como se indicó en la Parte Experimental, el método se ha evaluado en términos de selectividad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos y eficiencia. Los resultados obtenidos para estas muestras de validación se indican en la **Tabla 30**. Se ha establecido un límite de calidad de hit de 500 para poder aplicar el test de conformidad de adulterantes y éste es el motivo por el que no se ha considerado la segunda opción de las muestras 45 y 46.

Tabla 29.1 Resultados del test cualitativo ATR-MIR para las muestras ensayadas (1 a 25).

Muestra	Cal. de hit	RESULTADO DE LA BIBLIOTECA	RESULTADO DEL TEST DE CONFORMIDAD					
			Levamisol	Cafeína	Fenacetina	Tetracaína	Procaína	Lidocaína
1	963 842	Cocaína HCl Cocaína/levamisol	N	N	N	N	N	N
2	985 835	Cocaína/levamisol Cocaína HCl	S	N	N	N	N	N
3	973 893	Cocaína/levamisol CocaínaHCl	S	N	N	N	N	N
4	938 863	Cocaína/levamisol Cocaína HCl	S	N	N	N	N	N
5	937 867	Cocaína HCl Cocaína/levamisol	N	N	N	N	N	N
6	935 757	Cocaína/cafeína/levamisol/fenacetina/lidocaína Cocaína/cafeína/levamisol/fenacetina	S	S	S	N	N	S
7	897 793	Cocaína/cafeína/levamisol/fenacetina/lidocaína Cocaína/cafeína/levamisol/fenacetina	S	S	S	N	N	S
8	763 653	Cocaína/cafeína/tetracaína/fenacetina/procaína Cocaína/cafeína/tetracaína/procaína	N	S	N	S	S	N
9	986 827	Cocaína/levamisol Cocaína HCl	S	N	N	N	N	N
10	932 896	Cocaína/levamisol Cocaína HCl	S	N	N	N	N	N
11	926 823	Cocaína/levamisol Cocaína HCl	S	N	N	N	N	N
12	965 736	Cocaína/levamisol/cafeína Cocaína/levamisol	S	S	N	N	N	N
13	926 839	Cocaína HCl Cocaína/levamisol	N	N	N	N	N	N
14	987 862	Cocaína HCl Cocaína/levamisol	N	N	N	N	N	N
15	936 723	Cocaína/cafeína/fenacetina/tetracaína Cocaína/cafeína/fenacetina	N	S	S	S	N	N
16	937 849	Cocaína/levamisol Cocaína HCl	S	N	N	N	N	N
17	957 832	Cocaina/levamisol Cocaína HCl	S	N	N	N	N	N
18	928 859	Cocaina/levamisol Cocaína HCl	S	N	N	N	N	N
19	963 826	Cocaina/levamisol Cocaína HCl	S	N	N	N	N	N
20	951 949	Cocaina/levamisol Cocaína HCl	N	N	N	N	N	N
21	978 753	Cocaína/levamisol/cafeína/lidocaína Cocaína/levamisol/cafeína	S	S	N	N	N	S
22	852 810	Cocaína/levamisol Cocaína HCl	S	N	N	N	N	N
23	820 787	Cocaína /cafeína Cocaína/levamisol/cafeína	S	S	N	N	N	N
24	881 867	Cocaína/fenacetina Cocaína/levamisol/fenacetina	S	N	S	N	N	N
25	831 826	Cocaína/cafeína Cocaína/levamisol/cafeína	S	S	N	N	N	N

Nota: Sustancia presente(S) y sustancia no presente (N) según los datos obtenidos por GC-MS. Casilla sombreada: acierto con el resultado del test de conformidad. Casilla en blanco: No procede realizar el test de conformidad.

Tabla 29.2 Resultados del test cualitativo ATR-MIR para las muestras ensayadas (26 a 50).

Muestra	Cal. de hit	RESULTADO DE LA BIBLIOTECA	RESULTADO DEL TEST DE CONFORMIDAD					
			Levamisol	Cafeína	Fenacetina	Tetracaína	Procaína	Lidocaína
26	700 555	Cocaína/levamisol/cafeína/tetracaina Cocaína/ cafeína/tetracaina/fenacetina/procaína	S	S	N	S	N	N
27	809 778	Cocaína/cafeína Cocaína/levamisol/cafeína	N	S	N	N	N	N
28	752 743	Cocaína/levamisol/cafeína Cocaína/cafeína	N	S	N	N	N	N
29	875 842	Cocaína/levamisol Cocaína HCl	S	N	N	N	N	N
30	988 893	Cocaína/levamisol Cocaína HCl	S	N	N	N	N	N
31	948 875	Cocaína/levamisol Cocaína HCl	S	N	N	N	N	N
32	875 775	Cocaína/fenacetina Cocaína/levamisol/fenacetina	N	N	S	N	N	N
33	903 823	Cocaína/fenacetina Cocaína HCl	N	N	S	N	N	N
34	746 707	Cocaína/levamisol/fenacetina Cocaína/fenacetina	N	N	S	N	N	N
35	943 837	Cocaína/fenacetina/cafeína Cocaína HCl	N	S	S	N	N	N
36	796 685	Cocaína/levamisol/fenacetina/cafeína Cocaína/levamisol/fenacetina/cafeína/procaína	S	S	S	N	N	N
37	683 642	Cocaína/cafeína/fenacetina/lidocaína Cocaína/cafeína/levamisol/fenacetina/lidocaina	N	S	S	N	N	S
38	988 783	Cocaína/levamisol/cafeína Cocaína/levamisol	S	S	N	N	N	N
39	577 573	Cocaína/levamisol/cafeína/tetracaina Cocaína/levamisol/cafeína	S	S	N	N	N	N
40	586 513	Cocaína/levamisol/cafeína/tetracaina Cocaína/levamisol/cafeína/fenacetina/	S	S	N	N	N	N
41	847 780	Cocaína/levamisol/fenacetina Cocaína/fenacetina	S	N	S	N	N	N
42	757 754	Cocaína/fenacetina Cocaína/levamisol/fenacetina	S	N	S	N	N	N
43	775 772	Cocaína/levamisol/fenacetina/cafeína Cocaína/fenacetina/cafeína	S	S	S	N	N	N
44	650 639	Cocaína/levamisol/fenacetina/cafeína Cocaína/fenacetina/cafeína	S	S	S	N	N	N
45	873 466*	Cocaína/levamisol/cafeína/tetracaína Cocaína/levamisol/cafeína	S	S	N	S	N	N
46	866 476*	Cocaína/levamisol/cafeína/tetracaína Cocaína/levamisol/cafeína	S	S	N	S	N	N
47	846 841	Cocaína/fenacetina/cafeína Cocaina/levamisol/fenacetina/cafeína	N	S	S	N	N	N
48	823 800	Cocaína/fenacetina/cafeína Cocaína/levamisol/fenacetina/cafeína	N	S	S	N	N	N
49	850 743	Cocaína/fenacetina/lidocaína/procaína Cocaína HCl	N	N	S	N	S	S
50	872 726	Cocaína/cafeína/tetracaína/procaína Cocaína/cafeína/fenacetina/tetracaína/procaína	N	S	N	N	S	N

Nota: Sustancia presente(S) y sustancia no presente (N) según los datos obtenidos por GC-MS. Casilla sombreada: acierto con el resultado del test de conformidad. Casilla en blanco: No procede realizar el test de conformidad.*Resultado rechazado.

Tabla 30. Resultado de los parámetros para la evaluación del método cualitativo ATR-IR desarrollado para la identificación de los adulterantes en las muestras de cocaína considerando las expresiones indicadas en la **Tabla 15**.

<u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>
Selectividad	100%
Especificidad	100%
Falsos Positivos	0%
Falsos Negativos	0%
Eficiencia	100%

La comparación de los espectros de las muestras del conjunto de prueba con la biblioteca y la posterior confirmación con el método de conformidad hace que el método cualitativo propuesto no presente ni falsos positivos ni falsos negativos. De manera que este procedimiento ATR-MIR presenta una selectividad, especificidad y eficiencia del 100 % para cada uno de los adulterantes, por lo que resulta adecuado para el análisis cualitativo de las muestras de cocaína decomisadas.

4.2.2.2 Modelo PLS-ATR-MIR para la determinación cuantitativa de cocaína

Se estableció un modelo general para la determinación de cocaína en muestras decomisadas empleando la regresión PLS. La asignación de las muestras al conjunto de calibración y de validación se realizó en función del adulterante presente, de manera que en el conjunto de calibración estuviera presente al menos una de cada una de las combinaciones posibles de adulterantes encontradas. En caso de que hubiera más de una muestra, se asignó la mitad de las muestras al conjunto de calibración y el resto de muestras al conjunto de validación, seleccionándolas de modo que el intervalo de concentraciones fuera lo más parecido en cada uno de los conjuntos. Para comprobar la correcta distribución de las muestras en los conjuntos de calibración y validación se hizo

un estudio PCA, de manera que la representación gráfica de los *scores* del PC₁ y PC₂ permitió comprobar si la distribución de las muestras de cada uno de los conjuntos era homogénea en todo el gráfico. Para la modelización se emplearon un total de 76 muestras en el conjunto de calibración, con una riqueza media de cocaína de 37.3 ± 25.2 % (p/p), y 40 muestras en el conjunto de validación, con una riqueza media del 31.7 ± 21.7 % (p/p). Los espectros utilizados para la creación del modelo se obtuvieron a partir del promedio de tres medidas ATR para cada una de las muestras. Para la selección de las regiones de calibración inicialmente se tuvieron en cuenta aquellas en las que aparecen las bandas de la cocaína y de los diferentes adulterantes; de modo que estas regiones se fueron acotando y probando diferentes pre-tratamientos de los datos de manera que se obtuviera el menor valor de RMSECV. Posteriormente se optimizó el modelo para obtener la mejor capacidad predictiva para el conjunto de validación. Al realizar la representación gráfica de los *scores* PC₂ frente a PC₁ de todas las muestras consideradas en el estudio (**Figura 57**) se comprueba que las que aparecen situadas más hacia la izquierda del gráfico se corresponden con las que presentan mayor concentración de cocaína. Se trata de muestras en las que no se han detectado adulterantes o muestras adulteradas únicamente con levamisol, con una riqueza en cocaína clorhidrato comprendida entre un 60 y un 80 % (p/p). El resto de muestras aparecen más dispersas en el gráfico de *scores*, aunque se puede comprobar que aquellas que contienen el/los mismo/s adulterante/s quedan más próximas entre sí, como cabía esperar, pudiéndose diferenciar de forma cualitativa algunos de los grupos de muestras adulteradas. A modo de ejemplo, se pueden ver señaladas con el número 1 las muestras con elevada concentración de cocaína. El grupo 2 comprende las muestras adulteradas con levamisol y fenacetina. El grupo 3 contiene muestras adulteradas con levamisol y cafeína. La fenacetina y la cafeína son los adulterantes presentes en las muestras que aparecen en el grupo 4. Mientras que el grupo 5 corresponde con muestras adulteradas con levamisol, fenacetina y tetracaína. Sin embargo, éste análisis PCA no resultaría un método óptimo

para la clasificación de todas las muestras de cocaína consideradas, probablemente debido al elevado número de combinaciones de adulterantes existentes. En conclusión, se podría indicar que el PCA nos permite comprobar la idoneidad de la clasificación de las muestras en el conjunto de calibración y validación para el modelo PLS establecido.

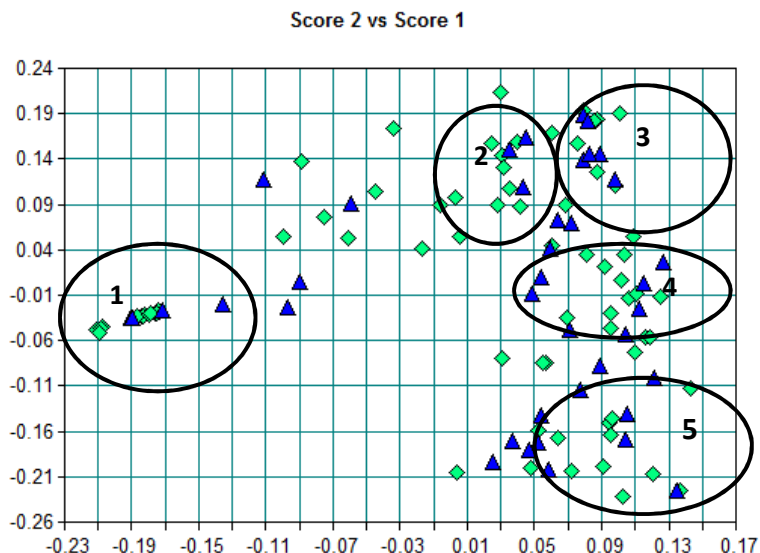


Figura 57. Representación gráfica de los *scores* PC_2 vs PC_1 para el PCA de las muestras empleadas en la calibración y la validación de la determinación de cocaína por ATR-MIR. Nota: \blacklozenge muestras de calibración, \blacktriangle muestras de validación. Asignación de los grupos: 1, Muestras con elevada concentración de cocaína. 2, Muestras adulteradas con levamisol/fenacetina. 3, Muestras adulteradas con levamisol/cafeína. 4, Muestras adulteradas con fenacetina/cafeína. 5, Muestras adulteradas con levamisol/fenacetina/tetracaína.

Después de probar a construir modelos considerando diferentes regiones espectrales y pre-tratamientos de los datos y tras considerar los resultados para la validación cruzada y del análisis del conjunto de validación, se ha seleccionado un modelo PLS cuyas características se resumen en la **Tabla 31**. Como se puede ver, se ha construido un modelo que con un pre-tratamiento de las regiones seleccionadas de normalización vectorial y con 4 factores, presenta un RMSECV de 5.61 % (p/p), un RMSEP de 4.42 % (p/p) y un RPD de 4.35.

Tabla 31. Parámetros del modelo PLS-ATR-MIR seleccionado para el análisis de cocaína en muestras adulteradas.

PARÁMETROS DEL MODELO PLS-ATR-MIR	
Modo de medida	ATR-MIR
	1626-1384
	970-820
Regiones del espectro (cm ⁻¹)	815-690
	579 -504
	499-400
Pre-tratamiento	Normalización vectorial
Factores	4
R ² (%)	96.16
RMSEE(% p/p)	5.07
RMSECV (% p/p)	5.61
RMSEP (% p/p)	4.42
RPD	4.53

4.2.3.3 Validación del modelo PLS ATR-MIR para la determinación de cocaína

Para la comparación del modelo con el método de referencia en términos de exactitud y precisión, un conjunto de 10 muestras adicionales se analizaron por ambos procedimientos (GC-FID y PLS-ATR-MIR).

Se realizó primero un análisis cualitativo para la determinación de adulterantes (**Tabla 32**) en el que se puede ver que el método cualitativo no presenta falsos positivos ni negativos para el conjunto de muestras estudiadas si comparamos los resultados obtenidos con el método de referencia GC-MS. Se determinó la riqueza en cocaína para las muestras mediante el modelo PLS-ATR-MIR establecido (ver resultados en **Tabla 33**) y tras aplicar el test estadístico correspondiente se comprobó que los resultados obtenidos por el método propuesto son estadísticamente comparables a los obtenidos por el método de referencia GC-FID.

Tabla 32. Resultados del test cualitativo ATR-MIR para las muestras problema ensayadas.

Muestra	Calidad de hit	RESULTADO DE LA BIBLIOTECA	RESULTADO DEL TEST DE CONFORMIDAD					
			Levamisol	Cafeína	Fenacetina	Tetracaína	Procaína	Lidocaína
1	599	Mezcla con cafeína/tetracaína/fenacetina/procaína	S	S	N	S	N	N
	507	Mezcla con levamisol/tetracaína	S	N	N	N	N	
2	947	Mezcla con levamisol	S	N	N	N	N	
	893	Cocaína HCl	N	S	S	S	N	
3	762	Mezcla con cafeína	N	S	S	S	N	
	723	Mezcla con cafeína/fenacetina/tetracaina	N	N	N	N	N	N
4	951	Mezcla con Levamisol	N	S	S	N	N	N
	943	Cocaína HCl	S	N	S	N	N	N
5	725	Mezcla con fenacetina/cafeína	S	S	S	N	N	N
	712	Mezcla con cafeína	S	N	S	N	N	N
6	698	Mezcla con fenacetina/cafeína/levamisol/tetracaína	S	S	S	N	N	N
	655	Mezcla con levamisol/fenacetina	S	S	S	N	N	N
7	545	Mezcla con levamisol/cafeína/tetracaína	S	S	S	N	N	N
	481	Mezcla con levamisol/cafeína/fenacetina	S	S	S	N	N	N
8	713	Mezcla con cafeína	S	S	S	N	N	N
	708	Mezcla con levamisol/cafeína/fenacetina	S	S	S	N	N	N
9	998	Mezcla con levamisol/cafeína/tetracaina	S	S	N	S	N	N
	440*	Mezcla con levamisol/cafeína/fenacetina	S	S	N	S	N	N
10	945	Mezcla con levamisol	N	N	N	N	N	N
	923	CocainaHCl	N	N	N	N	N	N

Nota: Sustancia presente(S) y sustancia no presente (N). Casilla sombreada: acierto con el resultado del método cualitativo. Casilla en blanco: No procede realizar el test de conformidad. *Resultado rechazado.

En la **Tabla33** se puede observar que la precisión para las tres réplicas de las muestras, en términos de repetibilidad da como resultado un coeficiente de variación menor del 1.0 %. Se puede afirmar que el método PLS-ATR-MIR proporciona niveles adecuados de exactitud y precisión para la determinación cuantitativa de las muestras de cocaína. En cuanto al límite de cuantificación (LOQ), considerando el criterio $LOQ = 10s$ y a partir de la desviación estándar de las muestras de menor riqueza, se ha estimado en un valor del 1.0% (p/p).

Tabla 33. Resultados obtenidos con el modelo PLS-ATR-MIR para un conjunto de muestras problema de cocaína y su comparación estadística con los valores de referencia.

Contenido en cocaína base (% p/p)			
Muestra	Valor de referencia GC-FID	Valor PLS-ATR-MIR	Diferencia
1	16.74	15.23 ± 0.12	-1.51
2	82.61	79.03 ± 0.04	-3.58
3	30.02	31.92 ± 0.06	1.90
4	78.23	80.42 ± 0.02	2.19
5	27.89	30.10 ± 0.04	2.21
6	17.39	19.43 ± 0.05	2.04
7	19.26	17.77 ± 0.01	-1.49
8	34.40	35.41 ± 0.09	1.01
9	9.21	9.71 ± 0.01	0.50
10	80.90	82.48 ± 0.01	1.58
		Media	0.50
		s	2.0
		t_{cal}	0.79
		t_{tab}	2.26

En conclusión, la técnica ATR-MIR constituye una poderosa herramienta en el laboratorio de drogas, ya que además de proporcionar resultados adecuados en términos de exactitud y precisión para la determinación cuantitativa de cocaína en las muestras decomisadas mediante la construcción de modelos de calibración PLS, también se puede utilizar en términos cualitativos para determinar los adulterantes presentes en las muestras con unos niveles de selectividad y especificidad adecuados, sin presentar falsos positivos ni negativos y de una forma rápida, limpia y no destructiva.

4.3 Determinación de cocaína mediante DR-NIR en presencia de los adulterantes más comunes

Como ya se ha comentado, en el primer estudio DR-NIR para la cuantificación de cocaína se elaboraron tres modelos, uno general, uno para cocaína a granel y otro para dosis de cocaína, todos ellos sin tener en cuenta la presencia de adulterante o la mezcla de adulterantes presentes en cada una de las muestras utilizadas para el conjunto de calibración. Dado que el número de muestras de dosis de cocaína utilizadas era muy pequeño (24 muestras) y conociendo todas las posibles combinaciones de adulterantes que se pueden encontrar, el número de muestras se considera demasiado bajo como para obtener un modelo adecuadamente representativo de la población en estudio, que resulte además lo suficientemente robusto para ser aplicado en el análisis de rutina de muestras de dosis. Es por esto que en esta sección se plantea un nuevo estudio con muestras de las que se ha determinado además su composición (en cuanto a la presencia de adulterantes) y que incluye también muestras sintéticas, preparadas con cocaína y adulterantes en diferente proporción, con el fin de aumentar la representatividad del conjunto de calibración y la posible mejora de la capacidad predictiva del modelo PLS.

En este caso se obtuvieron los espectros DR-NIR, tal como se explicó en la Parte Experimental y, tras aplicar la corrección de Kubelka-Munk, se trabajó con los espectros promedio para elaborar los modelos PLS. La asignación de las muestras al conjunto de calibración y de validación se realizó en función del adulterante presente; de manera que en el conjunto de calibración estuvieran presentes todas las combinaciones encontradas en las muestras analizadas en el laboratorio. La mitad de los espectros se incluyeron en el conjunto de calibración y el resto en el conjunto de validación.

El conjunto de calibración está constituido por un total de 99 muestras, con un intervalo de riqueza en cocaína base comprendido entre el 0.99 y el 82.4 % (p/p), y con una riqueza media del 36.2 ± 22.1 % (p/p). En el conjunto de validación se han incluido otras 99 muestras, con un intervalo de riqueza del 3.8 al 79.5 % (p/p), y una riqueza media del 34.7 ± 18.8 % (p/p).

En cuanto a la selección de las regiones espectrales y el pre-tratamiento, se partió de las condiciones que se habían seleccionado en el modelo antes propuesto y se fueron realizando modificaciones para obtener las condiciones que proporcionaran el RMSEP más bajo. Para comprobar que la asignación de las muestras a cada uno de los conjuntos fue adecuada se realizó un estudio PCA. Al realizar la representación gráfica de los *scores* PC_2 vs PC_1 se puede comprobar cómo la distribución para los conjuntos de calibración y validación es homogénea en el área del gráfico (**Figura 58**).

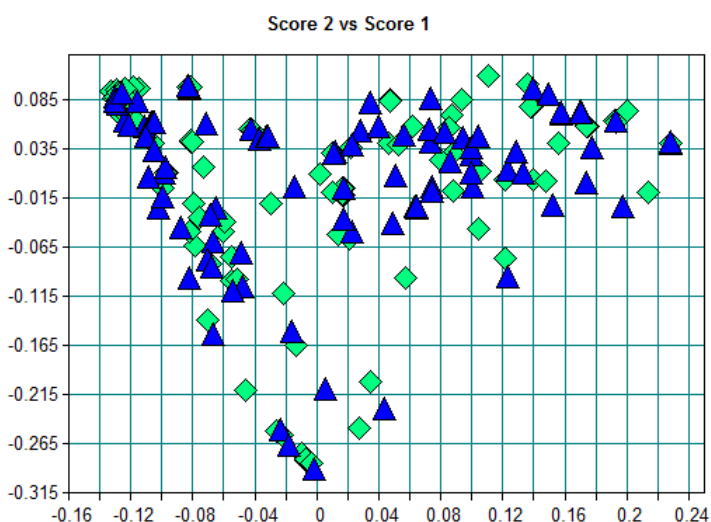


Figura 58. Representación gráfica de los *scores* PC_2 vs PC_1 para el PCA de las muestras empleadas en los conjuntos de calibración y validación del modelo PLS-DR-NIR. Nota: \blacklozenge muestras de calibración, \blacktriangle muestras de validación.

En la **Tabla 34** se indican las características del modelo PLS-DR-NIR que proporcionó los mejores resultados en el análisis del conjunto de validación. Se

obtuvo un modelo con 6 factores, para los datos de la región espectral entre 7500.0 y 5320.8 cm^{-1} , con un pre-tratamiento de los mismos consistentes en primera derivada y normalización vectorial, que presenta errores de calibración, validación cruzada y predicción del mismo orden con un RMSEE de 3.40 % (p/p), un RMSECV de 3.83 % (p/p), un RMSEP para las muestras del conjunto de validación de 3.86 % (p/p) y un RPD de 4.85.

Tabla 34. Parámetro del modelo PLS-DR-NIR seleccionado para el análisis de cocaína en muestras adulteradas.

PARÁMETROS DEL MODELO PLS-DR-NIR	
Modo de medida	DR-NIR
Muestras utilizadas	198 espectros de muestras adulteradas (99 de calibración y 99 de validación)
Regiones del espectro (cm^{-1})	7500.0-5320.8
Pre-procesado	Primera derivada + Normalización vectorial
Factores	6
R²(%)	97.78
RMSEE(% p/p)	3.40
RMSECV (% p/p)	3.83
RMSEP (% p/p)	3.86
RPD	4.85

Para la validación del modelo en muestras diferentes a las utilizadas en el conjunto de calibración y de validación, se analizó por el modelo PLS-DR-NIR las 10 muestras que habían sido analizadas por el modelo PLS-ATR-MIR. Los resultados obtenidos se indican en la **Tabla 35**.

Tabla 35. Resultados obtenidos para el análisis de un conjunto de muestras problema nuevas por el modelo PLS-DR-NIR propuesto para el análisis de muestras adulteradas y comparación estadística con los valores de referencia obtenidos por GC-FID.

Contenido en cocaína base (% p/p)			
Muestra	Valor de referencia GC-FID	Valor PLS-DR-NIR	Diferencia
1	16.7	15.5±0.1	-1.2
2	82.6	83.2±0.1	0.6
3	30.0	26.8±0.1	-3.2
4	78.2	78.5±0.0	0.3
5	27.9	26.0±0.3	-1.9
6	17.4	19.8±0.1	2.4
7	19.3	23.5±0.3	4.2
8	34.4	33.7±0.6	-0.7
9	9.2	10.0±0.1	0.8
10	80.9	78.0±0.1	-2.9
		Media	-0.17
		<i>s</i>	2.32
		t_{cal}	0.23
		t_{tab}	2.26

Como se puede ver, los resultados obtenidos con el modelo PLS-DR-NIR son estadísticamente comparables a los obtenidos por el método de referencia GC-FID cuando se aplica una prueba estadística de parejas de valores. En cuanto a la precisión obtenida para las muestras problema, el coeficiente de variación es inferior al 2 % para todas las muestras consideradas. En cuanto al límite de cuantificación (LOQ), considerando el criterio $LOQ = 10s$ y a partir de la desviación estándar de las muestras de menor riqueza, se ha estimado en un valor del 1.4 % (p/p).

En conclusión, el modelo inicial de dosis, en el que no se había tenido en cuenta las sustancias adulterantes, no proporcionó resultados comparables al método de referencia; probablemente debido como se ha comentado, a que el conjunto de calibración no era representativo de la población teniendo en cuenta todas las posibles combinaciones de adulterantes. Al aumentar el número de muestras

en el modelo inicial PLS-DR-NIR e incluir las combinaciones de adulterantes encontradas en las muestras de cocaína y con ayuda del estudio PCA para la asignación de las mismas al conjunto de calibración y validación, se consigue un modelo PLS-DR-NIR que proporciona resultados con una elevada precisión y estadísticamente comparables al método de referencia, permitiendo tomar medidas directas en el vial sin prácticamente necesidad de manipulación de la muestra.

Comparando el método PLS-DR-NIR para muestras adulteradas con el previamente publicado hay que destacar que el nuevo método permite reducir el número de factores de los 8 del modelo general y 7 del modelo para muestras de dosis a tan solo 6, comparable a los factores del modelo para muestras a granel de alta concentración y que el RMSEP pasó de 4.02 % (p/p) para el Modelo Granel a 3.86 % (p/p) en este modelo extendido, pasando el RPD de 3.92 a 4.85. Todas estas mejoras habría que atribuir las al aumento del número de muestras de calibración (desde 34 para el Modelo General, 28 para el modelo de las muestras a granel de alta concentración y tan solo 14 para el Modelo Dosis) a 99 en este caso. Además prueba de la mayor robustez del nuevo modelo extendido es el hecho de que los datos de predicción se refieran a 99 muestras adulteradas del mercado a diferencia de los anteriores modelos que solo se validaron para 44, 26 y 10 muestras para los modelos General, Granel y Dosis respectivamente.

En cualquier caso y tal como se indica en la **Tabla 36** el método PLS-DR-NIR ofrece una alternativa sostenible, rápida y barata frente al método cromatográfico.

Tabla 36. Comparación entre el método GC-FID y el método PLS-DR-NIR para la determinación de cocaína en muestras adulteradas.

Parámetro	GC-FID	PLS-DR-NIR
Tiempo de análisis	15 min/muestra (solo una réplica)	Menos de 5 min por muestra incluyendo la homogenización y la medida por triplicado.
Disolventes y reactivos	Etanol y tetracosano*	No
Alteración de la muestra	Se disuelve la muestra	Se conserva la muestra en el vial
Desechos	Residuos de disolvente.	No

*Patrón interno.

4.3.1 Comparación de los valores obtenidos para las muestras problema con los modelos PLS-ATR-MIR y DR-NIR

Como se ha visto en las secciones anteriores, se han construido dos modelos PLS para la determinación cuantitativa de cocaína en muestras decomisadas en presencia de sus adulterantes más comunes, uno por medidas directas en viales de vidrio por DR-NIR y el otro mediante medidas directas ATR-MIR. Como se puede ver en la **Tabla 37**, los modelos PLS-DR-NIR y PLS-ATR-MIR obtenidos para las muestras adulteradas presentan una capacidad predictiva similar con un número de factores de 6 y 4, respectivamente.

Tabla 37. Comparación de los modelos PLS obtenidos para el análisis de muestras en polvo adulteradas que contienen cocaína por espectrometría infrarroja.

MODELO	PLS-DR-NIR	PLS-ATR-MIR
Modo de medida	DR-MIR	ATR-MIR
Muestras utilizadas	198 espectros de muestras adulteradas (99 de calibración y 99 de validación)	126 espectros de muestras adulteradas (76 de calibración y 40 de validación)
Regiones del espectro(cm⁻¹)	7500-5320.8	1626-1384 970-820 815-690 579 -504 499-400
Pre-procesado	Primera derivada + Normalización vectorial	Normalización vectorial
Factores	6	4
R² (%)	97.78	96.16
RMSEE (% p/p)	3.40	5.07
RMSECV (% p/p)	3.83	5.61
RMSEP (% p/p)	3.86	4.42
RPD	4.85	4.53

Ambos modelos se han comparado con el método de referencia GC-FID utilizando para ello un conjunto de diez muestras adulteradas. Se ha estudiado la regresión entre los valores de concentración obtenidos por GC-FID, PLS-DR-NIR y PLS-ATR-MIR (ver datos en las **Tablas 33 y 35**) En la **Figura 59** se indican las regresiones entre estas tres series de medidas.

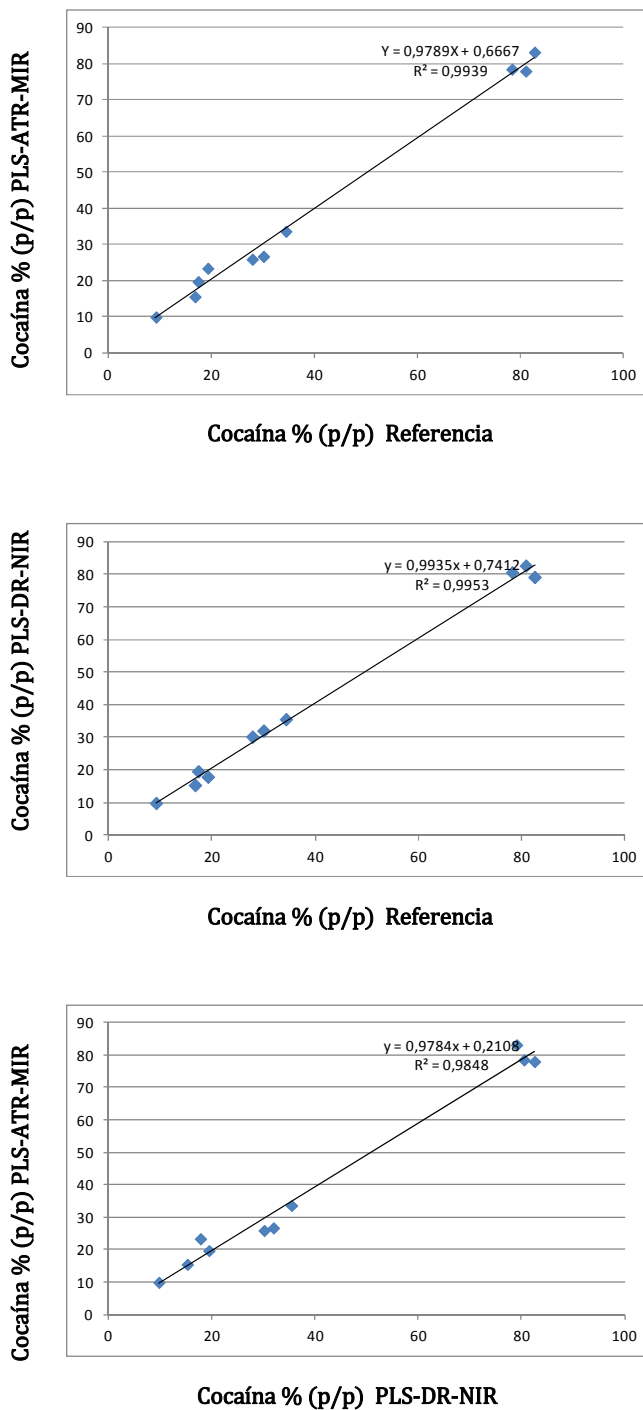


Figura 59. Comparación entre los valores de concentración de cocaína obtenidos para las muestras de validación mediante PLS-ATR-MIR, PLS-DR-NIR y GC-FID.

En conclusión, ambos métodos resultan adecuados para la determinación de cocaína en muestras adulteradas, si bien el modelo PLS-DR-NIR permite realizar medidas directas en el vial, lo que supone mayor rapidez en la adquisición de los espectros y evita las etapas de limpieza del cristal ATR, y por tanto se generan menos residuos. Por su parte, las medidas por ATR-MIR permiten identificar con claridad los adulterantes presentes en las muestras mediante el empleo de los test de conformidad, tal como se ha visto en el método cualitativo desarrollado. Por tanto la elección de una u otra técnica dependerá de los objetivos del análisis, y de las disponibilidades del laboratorio en cuanto a instrumentación, ya que ambas técnicas han demostrado proporcionar niveles adecuados de exactitud y precisión.

4.4 Determinación de cocaína en materiales impregnados

Cada vez es más frecuente la introducción de cocaína por las fronteras en forma de soportes impregnados con el objetivo de camuflarla entre ropa, en el interior de maletas o de otros elementos, y así poder burlar los controles policiales. En esta sección se ha desarrollado un método para la determinación de cocaína en soportes impregnados mediante el estudio de sus espectros ATR-MIR y DR-NIR. Se plantea el uso de éstas técnicas tanto para la determinación cualitativa directa de la cocaína en los soportes a través del reconocimiento de sus bandas características en el IR medio, que en la actualidad se realiza tras la extracción de la cocaína por lavado y posterior análisis por GC-MS, como para la determinación cuantitativa; en este caso mediante la construcción de dos modelos PLS, uno por ATR-MIR y un segundo modelo para los espectros DR-NIR adquiridos mediante el empleo de una sonda de fibra óptica.

4.4.1 Espectros ATR-MIR de los materiales impregnados

En este apartado, para construir un modelo de calibración PLS, se han considerado los espectros ATR-MIR inicialmente obtenidos a partir de dos tipos de materiales impregnados, que se comprobó tras un análisis cualitativo que correspondían con fieltro de poliéster blanco y fieltro de poliéster negro. Los soportes de fieltro de poliéster, tal como se ha comentado, son los que más habitualmente se suelen encontrar en los decomisos de materiales impregnados de cocaína. Posteriormente el estudio se amplió para otros dos tipos de soporte menos comunes, como son una espuma de poliuretano y láminas de pasta de papel. La caracterización de los materiales impregnados, tal como se ha explicado en la Parte Experimental, se ha realizado obteniendo los espectro ATR-MIR tras el lavado de los mismos, por inmersión en etanol hasta eliminar los restos de cocaína, y comparándolos con los espectros correspondientes a diferentes materiales textiles.

En la **Figura 60** se comparan los espectros ATR-MIR de los soportes impregnados estudiados en esta Tesis Doctoral con un patrón de cocaína clorhidrato. En los espectros de los soportes se pueden identificar claramente la presencia de las bandas características de la cocaína lo que pone de manifiesto el potencial de la técnica ATR-MIR para la detección de esta droga en materiales impregnados.

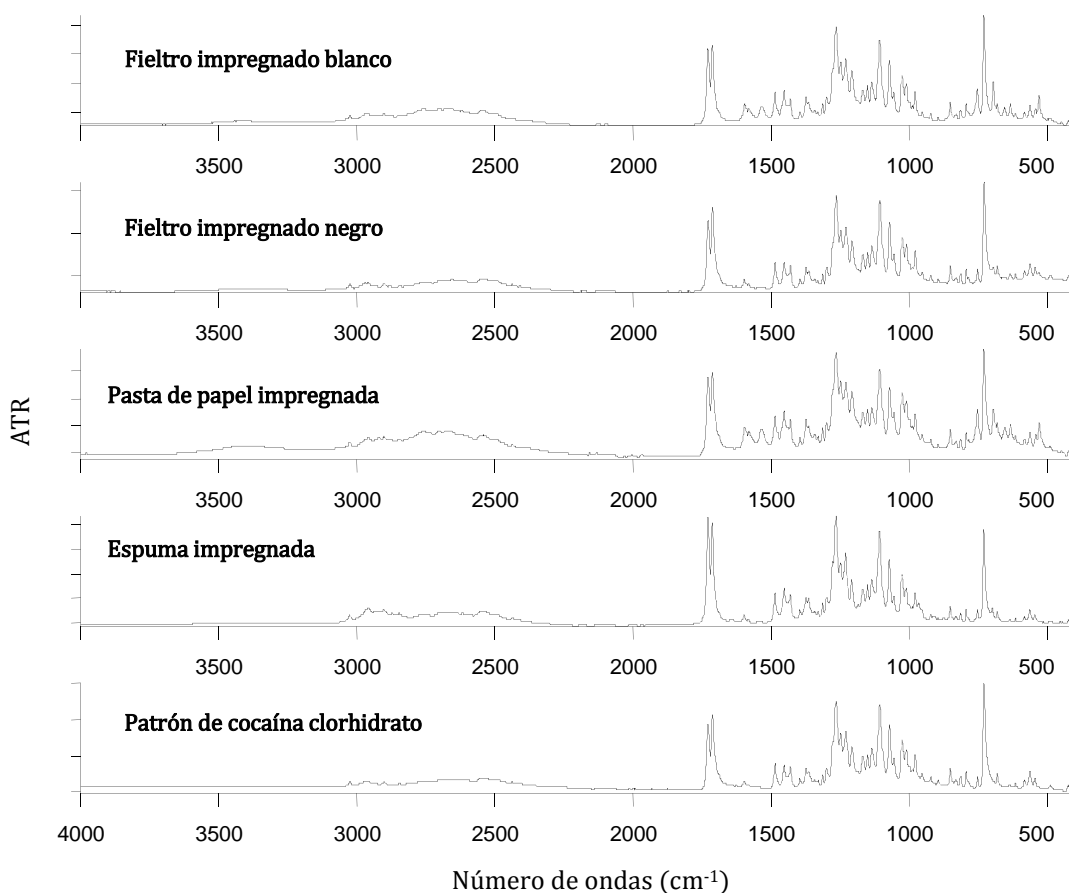


Figura 60. Espectros ATR-MIR de la cocaína clorhidrato y de los diferentes materiales impregnados estudiados

Para la determinación cualitativa de la cocaína en los soportes se utilizó el método de comparación de espectros desarrollado en la Sección 4.2.2 para la determinación de cocaína y sus adulterantes más comunes.

Como ya se ha comentado, el estudio se inició con los soportes impregnados de fieltro blanco y negro. La aplicación del test en los diferentes puntos de medida del material impregnado dio lugar a resultados con una calidad de *hit* del mismo orden para cada uno de ellos. A modo de ejemplo en la **Tabla 38** se indican los resultados obtenidos para tres puntos seleccionados al azar de cada uno de los soportes estudiados.

Tabla 38. Resultados obtenidos para el test cualitativo aplicado a los soportes impregnados.

<u>Tipo de soporte</u>	<u>Punto de muestreo</u>	<u>(cal. de hit) Resultado de la biblioteca</u>	<u>Test identidad</u>
Fieltro blanco	1	(842) Muestra de cocaína sin adulterar (823) Cocaína con levamisol	Negativo para todos los adulterantes.
	2	(975) Muestra de cocaína sin adulterar (813) Cocaína con levamisol	Negativo para todos los adulterantes.
	3	(827) Muestra de cocaína sin adulterar (805) Cocaína con levamisol	Negativo para todos los adulterantes.
Fieltro blanco	1	(779) Cocaína con levamisol (764) Muestra de cocaína sin adulterar	Negativo para levamisol.
	2	(773) Cocaína con levamisol (752) Muestra de cocaína sin adulterar	Negativo para levamisol.
	3	(731) Cocaína con levamisol (723) Muestra de cocaína sin adulterar	Negativo para levamisol.
Fieltro blanco	1	(777) Patrón de cocaína HCl (752) Muestra sin adulterar	Negativo para todos los adulterantes.
	2	(751) Patrón de cocaína HCl (718) Muestra de cocaína sin adulterar	Negativo para todos los adulterantes.
	3	(798) Patrón de cocaína HCl (706) Muestra de cocaína sin adulterar	Negativo para todos los adulterantes.
Fieltro negro	1	(876) Patrón de cocaína HCl (811) Muestra de cocaína sin adulterar	Negativo para todos los adulterantes.
	2	(901) Patrón de cocaína HCl (833) Muestra de cocaína sin adulterar	Negativo para todos los adulterantes.
	3	(885) Patrón de cocaína HCl (812) Muestra de cocaína sin adulterar	Negativo para todos los adulterantes.

Como se puede observar, el resultado del test cualitativo ATR-MIR resulta positivo para todos los puntos de medida considerados en los soportes, lo cual podría suponer que la impregnación en el soporte fuera homogénea si consideramos el parecido de los valores de *hit* obtenidos. Para comprobar la distribución de la droga en los diferentes soportes impregnados, se tomaron medidas en diferentes puntos y en ambas caras de los mismos. En la **Figura 61** se pueden ver los espectros de una muestra de tejido blanco de fieltro impregnado que corresponden a ambas caras de un mismo punto y, como puede comprobarse, los espectros son prácticamente idénticos, tanto en la distribución de las bandas como en la intensidad de las mismas. La **Figura 62** corresponde a los espectros de la muestra de fieltro negro, medida en las mismas condiciones que la anterior. Se observa también la coincidencia de los espectros de ambas caras, tanto en la presencia de las bandas como en la intensidad de las mismas.

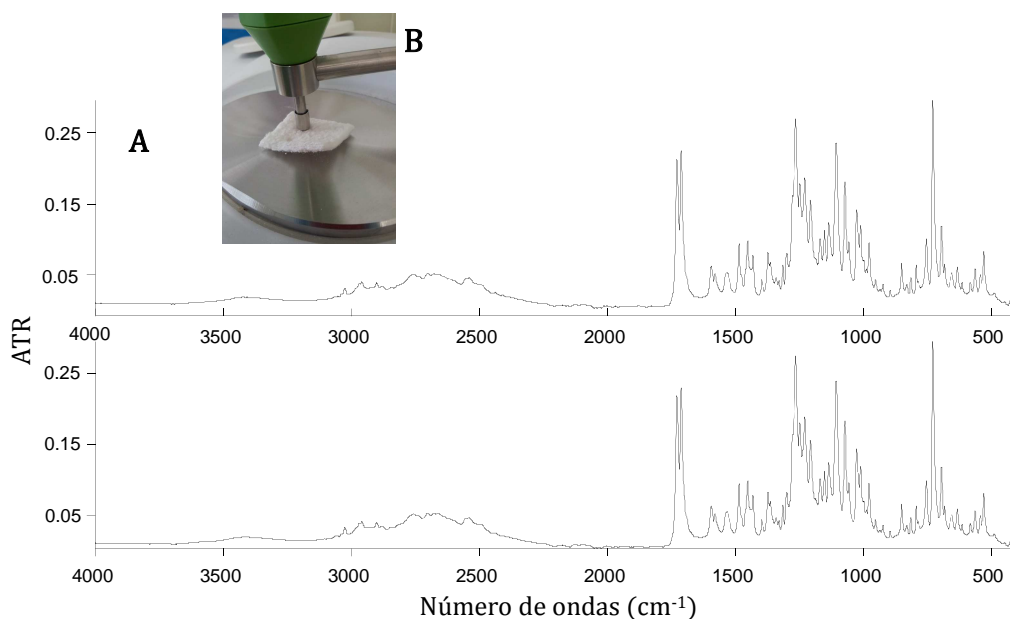


Figura 61. A. Espectros ATR-MIR obtenidos a partir de tejido de fieltro blanco impregnado registrados en el mismo punto por ambas caras. B. Detalle de la adquisición de los espectros.

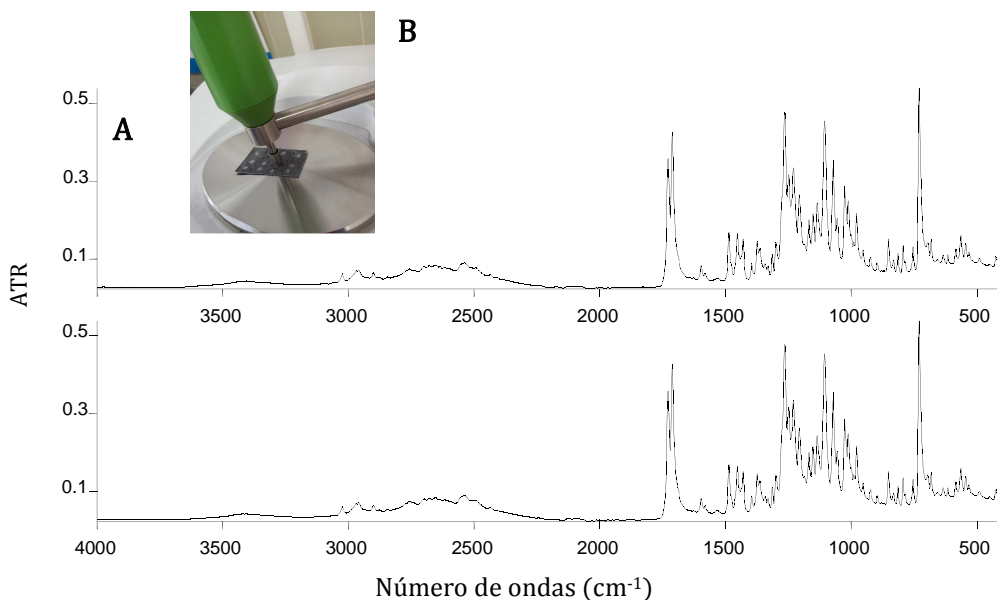


Figura 62. A. Espectros ATR-MIR obtenidos a partir de tejido de fieltro negro impregnado registrados en el mismo punto por ambas caras. B. Detalle de la adquisición de los espectros.

4.4.2 Espectros DR-NIR de los materiales impregnados

Se obtuvieron nuevamente espectros de las láminas de fieltro blanco y negro pero esta vez realizando medidas DR-NIR utilizando para ello una sonda de fibra óptica. Como se ha explicado en la Parte Experimental, el muestreo en este caso fue diferente, ya que al utilizar la sonda se pudieron registrar de forma sencilla espectros en diferentes puntos de toda la superficie del tejido y no sólo de una porción, como ocurría en el caso de las medidas ATR-MIR en el que, necesariamente, la muestra debía colocarse sobre el cristal del accesorio ATR. A diferencia del espectro ATR-MIR, en el espectro DR-NIR de las muestras consideradas se aprecian mayores diferencias entre los diferentes soportes. En la **Figura 63** se observan diferencias entre dos soportes impregnados, uno de fieltro blanco y otro de fieltro negro, especialmente en lo que se refiere al desplazamiento de la línea base del espectro para valores de número de ondas superiores a 4000 cm⁻¹. En cuanto a las bandas correspondientes a la cocaína se pueden identificar de forma clara a partir de los espectros obtenidos de los

soportes impregnados, tal como se hizo para las muestras en polvo en la Sección 4.1.1, poniendo de manifiesto el potencial de la técnica para la determinación de cocaína en soportes impregnados.

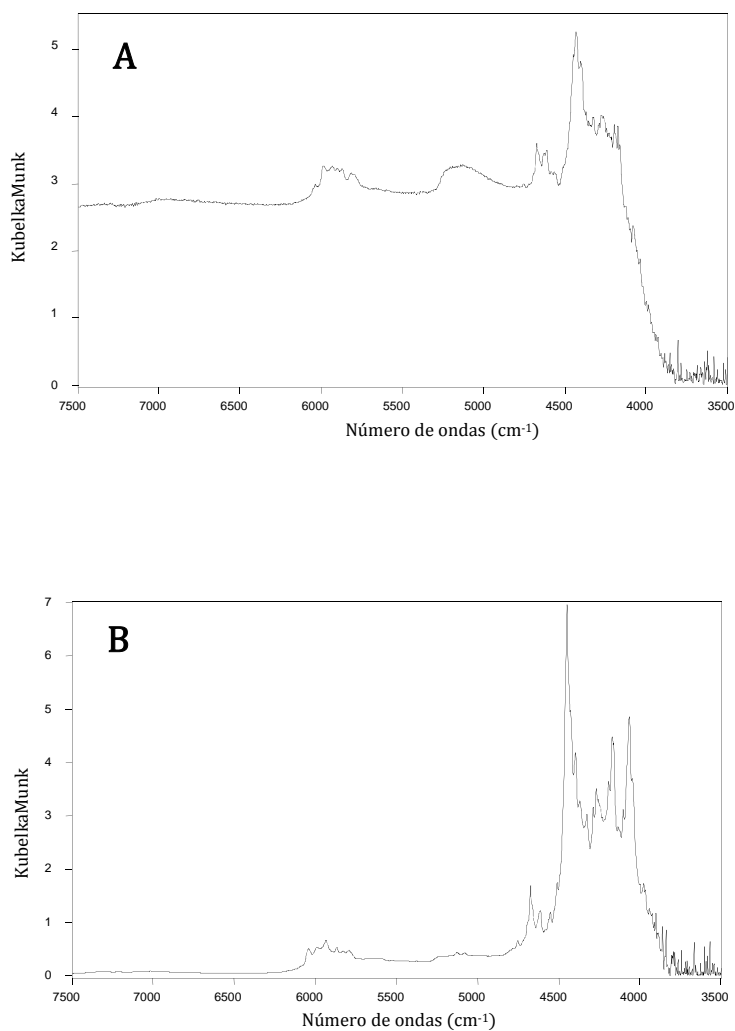


Figura 63. Espectros DR-NIR. A. Tejido de fieltro negro. B. Tejido de fieltro blanco.

Al igual que ocurría con las medidas ATR-MIR, en las **Figuras 64** y **65** se puede apreciar que los espectros obtenidos para cada una de las caras tanto del fieltro blanco como del negro, impregnados con cocaína, son prácticamente coincidentes entre sí.

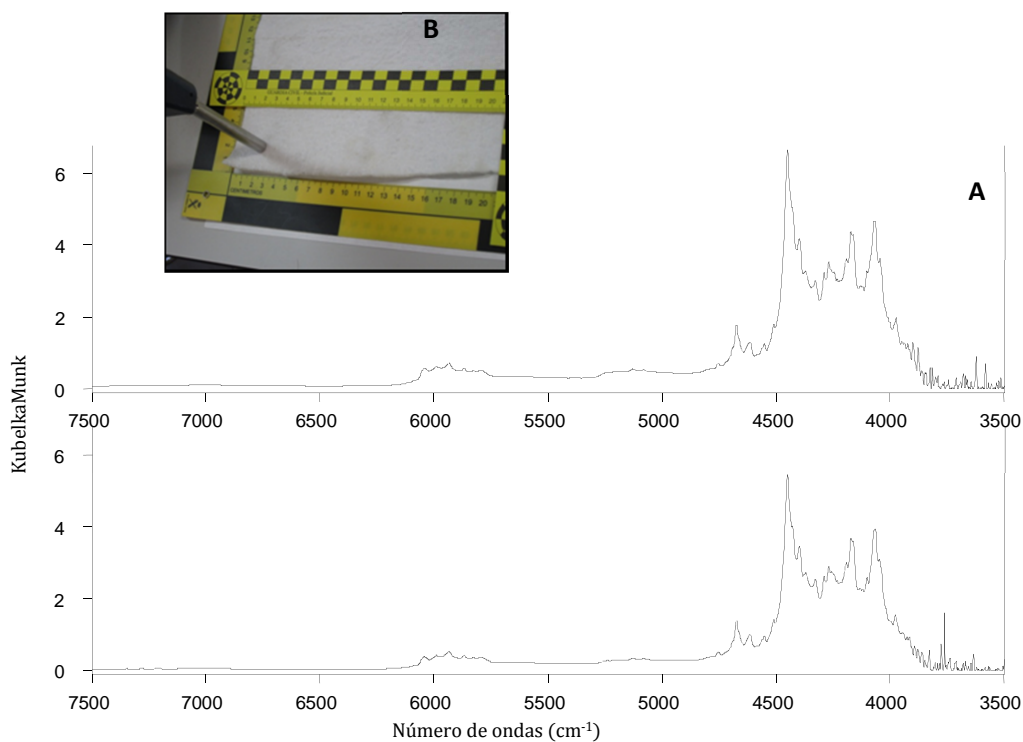


Figura 64. A. Espectros DR-NIR del tejido medido por ambas caras. B. Detalle de la adquisición de los espectros DR-NIR del tejido de fieltro blanco impregnado.

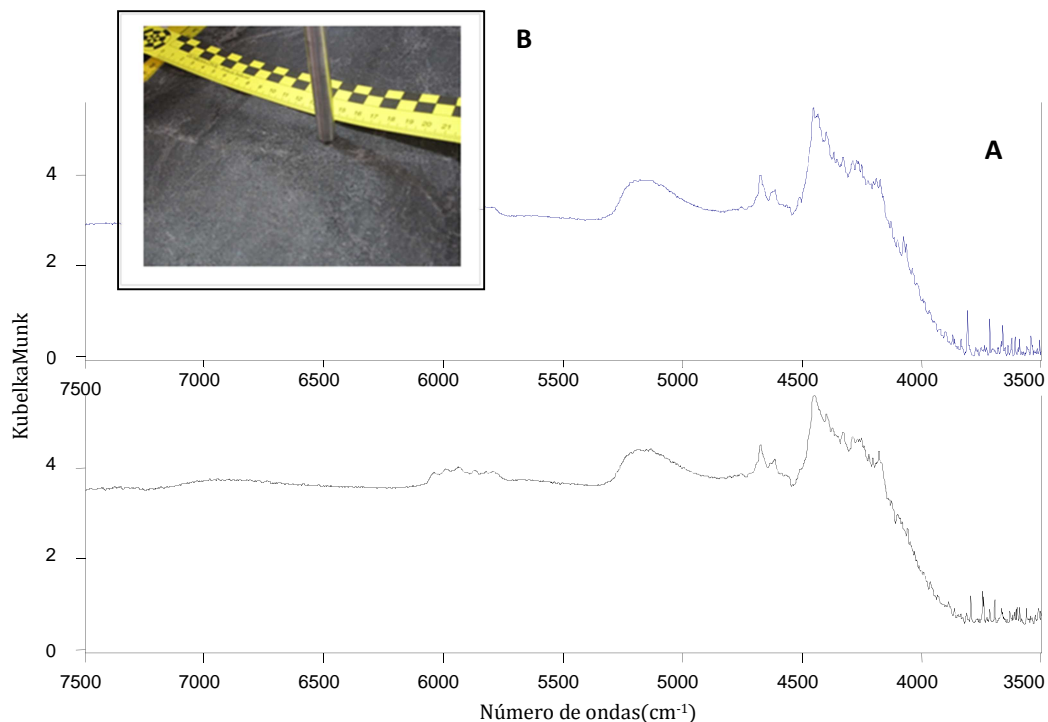


Figura 65. A. Espectros DR-NIR del tejido medido por ambas caras. B. Detalle de la adquisición de los espectros DR-NIR del tejido de fieltro negro impregnado.

Dado que las bandas de cocaína son fácilmente identificables tanto en las medidas por ATR-MIR como por DR-NIR y se aprecian pocas interferencias con los soportes estudiados, se utilizaron dichas técnicas para llevar a cabo una determinación cuantitativa mediante la construcción de modelos de calibración PLS sin necesidad de una extracción previa de la cocaína como en el caso del procedimiento de referencia por cromatografía. Para ello se construyeron dos modelos PLS, uno por cada una de las técnicas de medida.

4.4.3 Modelos PLS para la determinación de cocaína en soportes impregnados

A partir de los espectros IR de tres de las muestras de tejido impregnado (dos telas blancas y una tela negra), se construyeron dos modelos PLS, uno con los espectros obtenidos por ATR-MIR y otro con los medidos por DR-NIR

empleando la sonda de fibra óptica, considerando para ello como valores de referencia el contenido de cocaína obtenido mediante el análisis CG-FID de los extractos obtenidos a partir de los soportes impregnados. Para cada una de las telas se tomó un valor de referencia único (38.1 ± 1.5 , 40.1 ± 1.7 y 54.1 ± 2.1 % (p/p) de cocaína base, respectivamente), resultado de un promedio de análisis mediante el procedimiento GC-FID descrito en la Parte Experimental.

Para la calibración y validación del modelo PLS-ATR-MIR se emplearon un total de 51 espectros procedentes de los diferentes tejidos impregnados medidos en distintos puntos de los mismos. Para construir el conjunto de calibración se emplearon 28 espectros y el resto se incluyeron como conjunto de validación.

En la calibración y validación del modelo PLS-DR-NIR se emplearon 44 espectros procedentes de diferentes medidas de las telas impregnadas, 24 de los cuales se incluyeron en el conjunto de calibración y los 20 restantes en el de validación.

La distribución de las muestras en los conjuntos de calibración y validación, como ya se ha comentado, se realizó de manera que aproximadamente la mitad de las muestras quedaran en el conjunto de calibración y que el número de medidas (espectros empleados) para cada tejido y muestra fuera similar. La asignación de los espectros a cada uno de los conjuntos se realizó de manera arbitraria después de aplicar un PCA al estudio de los mismos y comprobar mediante la representación gráfica de los *scores* PC_2 vs PC_1 que existía una distribución homogénea de los espectros en todo el espacio del gráfico (**Figura 66**).

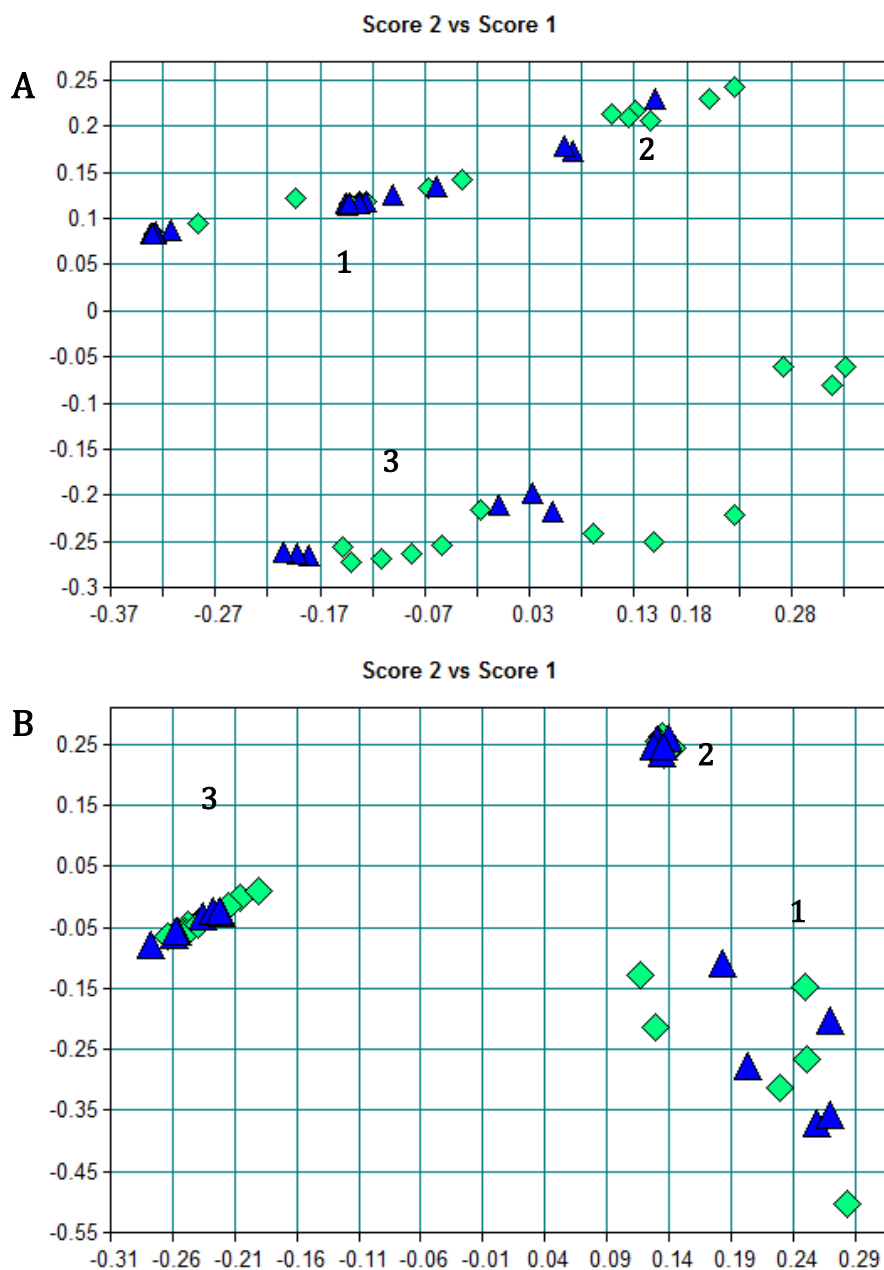


Figura 66. Gráfico de *scores* PC_2 vs PC_1 para los espectros de los modelos PLS-ATR-MIR (A) y PLS-DR-NIR (B) correspondientes a muestras impregnadas de cocaína. Nota: Espectros de fieltro negro conteniendo 54.09 % (p/p) (1); (2) espectros de fieltros o blancos conteniendo 38.07 % (p/p) (2) y 40.02%.(p/p) (3). ◆ muestras de calibración, ▲ muestras de validación.

En la **Figura 66** se puede apreciar la agrupación de las muestras en función del soporte impregnado y como la distribución entre los conjuntos de calibración y validación es homogénea en el espacio del gráfico de *scores*. Cabe destacar que las medidas DR-NIR para cada uno de los soportes aparecen de forma más agrupada en su respectivo gráfico que las obtenidas por ATR-MIR.

En cuanto a la selección de las regiones de calibración y el tipo de pre-tratamiento de los espectros empleados en la construcción de los modelos PLS, se han tenido en cuenta las regiones del espectro en las que aparecen las principales bandas de la cocaína, que se han ido acotando y probando también diferentes pre-tratamientos, que incluyen normalización vectorial, eliminación de desnivel constante, sustracción de línea recta, normalización de mínimos y máximos, corrección de dispersión multiplicativa, MSC (*Multiple Scatter Correction*), primera derivada y segunda derivada, así como primera derivada combinada con normalización vectorial, sustracción de línea recta o corrección de dispersión multiplicativa, de manera que se obtuviera el menor RMSECV; posteriormente se optimizó el modelo y se seleccionó aquel con el que se obtuviera la mayor capacidad predictiva para el conjunto de validación, esto es, el menor error de predicción.

En la **Tabla 39** se resumen los parámetros de los mejores modelos PLS obtenidos para cada tipo de medida, con indicación de los valores de los errores de la calibración, la validación cruzada y el análisis del conjunto de validación.

Tabla 39. Parámetros de los modelos PLS seleccionados para la determinación por espectroscopia infrarroja de cocaína en soportes impregnados.

MODELO	PLS-DR-NIR	PLS-ATR-MIR
Modo de medida	Sonda DR-NIR	ATR-MIR
Muestras utilizadas	44 espectros de tres soportes impregnado	51 espectros de tres soportes impregnados
Regiones del espectro (cm⁻¹)	6136.5-5882.0 5876.2-5523.3 5197.4-4142.5	3108-2370 1392-1267 989-889 654-542
Pre-procesado	Normalización vectorial	Primera derivada
Factores	6	6
R²(%)	99.7	97.8
RMSEE (% p/p)	0.43	1.12
RMSECV (% p/p)	1.94	1.54
RMSEP (% p/p)	0.88	0.60
RPD	7.54	13.2

Como se puede apreciar, tanto el modelo PLS-DR-NIR como el modelo PLS-ATR-MIR requieren de 6 factores, aunque este último presenta mayor capacidad predictiva para las muestras del conjunto de validación, ya que mientras el modelo con sonda presenta un RMSEP de 0.88 % (p/p), con el modelo PLS-ATR-MIR se obtuvo un 0.60 % (p/p), con un valor del RPD de 13.2 frente a un 7.54 del modelo PLS-DR-NIR. Hay que tener en cuenta que la toma de muestras para cada uno de los modelos ha sido diferente, de manera que en el modelo PLS-DR-NIR se ha llevado a cabo un mapeo de toda la superficie del tejido haciendo uso de la sonda de fibra óptica, mientras que para el modelo PLS-ATR-MIR se han empleado porciones de cada uno de los tejidos impregnados y sobre ellas se ha realizado un mapeado más reducido y acorde a sus dimensiones. En todo caso, para la totalidad de la tela se ha considerado un único valor de referencia.

4.4.4 Aplicación de los modelos obtenidos a una muestra problema

Se aplicó el test cualitativo ATR-MIR en dos pasos a una muestra problema de fieltro blanco impregnado de dimensiones 5 x 8 cm² procedente de un nuevo decomiso. A partir de ello se obtuvieron los siguientes resultados: la biblioteca identificaba en primer lugar muestra como de cocaína sin adulterar y en segundo lugar como una muestra de cocaína adulterada con levamisol, con una calidad de *hit* de 815 y 751 respectivamente, tomando un punto de medida al azar. Cuando se consideran puntos de medida diferentes, los valores de calidad de hit obtenidos fueron del mismo orden. Finalmente se aplicó el test de identidad para los adulterantes esperados y el resultado fue negativo. Por tanto estamos ante una muestra de fieltro blanco impregnado de cocaína sin adulterar.

Para verificar la exactitud de los modelos PLS seleccionados se llevó a cabo una validación empleando la muestra problema de tejido blanco impregnado. Se registraron los espectros de dicho tejido, tanto por ATR-MIR como por DR-NIR; y se compararon los valores predichos por los modelos PLS con los obtenidos después de analizar la muestra por el método de referencia GC-FID. A continuación se comentan los resultados obtenidos para este estudio.

Se realizaron medidas por DR-NIR en cinco puntos de cada uno de las caras del tejido. Una vez obtenidos los espectros se hizo un estudio PCA de éstos y se representaron en el mismo gráfico de *scores* que el empleado para el conjunto de calibración y validación del modelo PLS-DR-NIR seleccionado. Al comparar la distribución de las nuevas muestras en la representación gráfica de los *scores* PC₂ vs PC₁ (**Figura 67**) se aprecia como las señales correspondientes a la muestra problema se agrupan aproximándose a las del soporte impregnado de tela de fieltro blanca con un contenido en cocaína base de un 38.1 % (p/p) y que aparece en la parte superior derecha del gráfico. Esto indica que el soporte presenta unas características similares a las del tejido de fieltro blanco y que,

por tanto, el modelo PLS considerado debería ser adecuado para la cuantificación de esta nueva muestra problema. Por otro lado también se puede considerar que probablemente la impregnación sea homogénea dado que los *scores* de los espectros correspondientes a las réplicas de ambas caras de este tejido impregnado quedan muy agrupados entre sí.

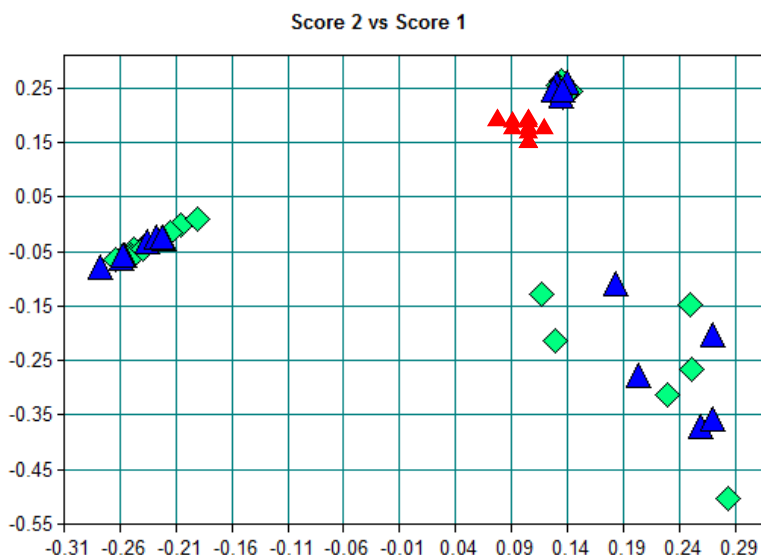


Figura 67. Representación de una nueva muestra de tejido impregnado en el gráfico de *scores* PC₂ vs PC₁ de las muestras de calibración y validación del modelo PLS-DR-NIR. Nota: ◆ muestras de calibración, ▲ muestras de validación, ▲ nuevas medidas.

En el caso del modelo PLS-ATR-MIR, los espectros de la muestra problema se han obtenido realizando 8 medidas por cada una de las caras, ya que el *tip* de tres milímetros, al ocupar menor superficie que la sonda permite realizar más medidas que ésta. Como en el caso anterior, se llevó a cabo un estudio PCA de los espectros obtenidos para la nueva muestra problema junto con los empleados en el conjunto de calibración y validación del modelo PLS-ATR-MIR y en la representación gráfica de los *scores* PC₂ vs PC₁ (**Figura 68**) se puede comprobar, al igual que ocurría en el caso de las medidas DR-NIR, que las señales que corresponden a los espectros problema se sitúan agrupadas

Tabla 40. Resultados obtenidos por los modelos PLS en el análisis de una nueva muestra de tejido impregnado y comparación estadística de los mismos.

Modelo PLS-DR-NIR		Modelo PLS-ATR-MIR	
Punto de muestreo	Valor obtenido cocaína base, % (p/p)	Punto de muestreo	Valor obtenido cocaína base, % (p/p)
Cara A			
1	42.56	1	42.20
2	43.02	2	42.32
3	43.04	3	39.55
4	42.87	4	41.32
5	41.93	5	41.43
		6	43.16
		7	41.10
		8	41.16
Media Cara A	42.7 ± 0.5	Media cara A	41.5 ± 1.1
Cara B			
6	43.02	9	42.81
7	42.23	10	42.87
8	42.39	11	41.57
9	42.43	12	45.16
10	42.51	13	40.12
		14	43.97
		15	40.03
		16	45.22
Media Cara B	42.5 ± 0.3	Media cara B	42.7 ± 2.0
Cara A+B			
Media A+B	42.6 ± 0.4	Media A+B	42.1 ± 1.7
Comparación de los valores obtenidos por ambos modelos		t_{cal}	1.13
		t_{tab}	2.10
Comparación de resultados obtenidos con los modelos PLS con el valor de referencia (método GC-FID)			
Valor de referencia		41.4 ± 2.6 (n=3)	
t_{cal}	0.82	t_{cal}	0.64
t_{tab}	4.3	t_{tab}	2.10

Para comparar los valores obtenidos, se aplicó el test t de comparación de medias. En el caso del modelo PLS-DR-NIR la desviación estándar no es estadísticamente comparable con la del método de referencia, ya que las medidas NIR presentan mayor precisión que los datos obtenidos por GC-FID. Los resultados obtenidos tanto para el modelo PLS-DR-NIR como para el modelo PLS-ATR-MIR resultaron estadísticamente comparables a los obtenidos con el método de referencia. En cuanto a la precisión de los modelos PLS, las medidas obtenidas por el modelo PLS-DR-NIR son más precisas, esto se confirmó al comparar las medidas realizadas sobre la misma superficie por ambos modelos. Se observó que en el análisis de esta muestra el modelo PLS-DR-NIR resultó más preciso, presentando un coeficiente de variación del 1 % frente al 4 % para el modelo PLS-ATR-MIR (**Tabla 40**).

Un test t de comparación de medias aplicado a la comparación de los valores obtenidos por cada uno de los modelos PLS evidencia que no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al valor obtenido con el método de referencia GC-FID. Asimismo, los valores medios de contenido de cocaína obtenidos por cada uno de los modelos PLS son estadísticamente comparables entre sí, a pesar de que el modelo PLS-DR-NIR presenta una precisión mayor.

En la **Tabla 41** se muestran los datos de precisión intermedia para el modelo PLS-ATR-MIR, que como se ha dicho es el que presenta menor precisión de los dos estudiados. Para ello se tomaron medidas de la muestra problema en tres días diferentes. Se realizaron 8 medidas para cada una de las caras y se calcularon los contenidos de cocaína base haciendo uso del mismo modelo PLS-ATR-MIR.

Tabla 41. Estudio de la precisión de las medidas de cocaína empleando el modelo PLS-ATR-MIR.

Contenido de cocaína base, % (p/p)			
Punto de muestreo	Día 1	Día 2	Día 3
Cara A			
1	42.20	42.08	43.09
2	42.32	40.54	40.19
3	39.55	41.98	44.17
4	41.32	42.84	44.07
5	41.43	39.70	42.07
6	43.16	38.99	43.08
7	41.10	42.14	37.04
8	41.16	38.67	42.52
Media cara A	41.5±1.1	40.9±1.6	42.0±2.4
Cara B			
9	42.81	39.98	42.67
10	42.87	42.43	44.23
11	41.57	40.13	41.88
12	45.16	43.09	40.34
13	40.12	46.56	41.11
14	43.97	42.66	41.17
15	40.03	38.05	43.75
16	45.22	38.30	43.60
Media Cara B	42.7±2.0	41.4±2.8	42.3±1.4
Cara A+B			
Media	42.1±1.7	41.1±2.2	42.2±1.9
Media (3 días)			41.8±2.0
RSD (%)			4.7%

Como puede comprobarse de los resultados indicados en la **Tabla 41**, la precisión en cada uno de los días de medida, expresada como coeficiente de variación, varía desde un 2.6 % hasta un 6.7 %. Los valores medios obtenidos para cada uno de los días, considerando las dos caras, resultan estadísticamente comprables entre sí, tanto los contenidos promedio obtenidos como la precisión de los mismos. Para el conjunto de todas las medidas se ha obtenido un coeficiente de variación global del 4.7 %. La mayor variación se obtuvo

considerando las medidas de cada cara por separado lo cual indica que pequeñas variaciones en el punto de medida podrían influir en la precisión. Aun así, los valores medios considerando ambas caras presentan resultados de precisión similar y, por tanto, el método PLS-ATR-MIR se considera adecuado para la determinación cuantitativa de cocaína en los soportes impregnados cuando se compara con el valor de referencia tanto en términos de precisión como también de exactitud.

En conclusión, el estudio PCA sirvió para establecer una estimación de la idoneidad del modelo para la determinación de cocaína en las muestras problema, considerando que ambos modelos, tanto el PLS-ATR-MIR como el PLS-DR-NIR, resultan adecuados para la determinación de cocaína en tejidos impregnados cuando se emplean muestras impregnadas, previamente caracterizadas, para construir los modelos de calibración. El modelo PLS-DR-NIR, por sus características de medida podría ser más útil en el caso de soportes de mayor dimensión, ya que permite hacer un mapeo de una gran superficie del tejido con mayor facilidad, mientras el PLS-ATR-MIR lo sería en el caso de muestras de dimensiones más reducidas, ya que el tamaño del *tip* permitiría obtener una mayor número de medidas.

Una vez comprobado que los modelos son útiles para la determinación de cocaína en tejidos de fieltro impregnados que, como ya se ha indicado, son los soportes más comunes que suelen encontrarse en este tipo de incautaciones, el siguiente paso fue realizar un estudio considerando otros tipos de soportes. A continuación se presenta el supuesto de análisis de un soporte de pasta de papel impregnado de dimensiones reducidas (6 x 4 cm², aproximadamente). En este caso se optó por emplear el modelo PLS-ATR-MIR que, como ya se ha indicado, permite obtener mayor número de medidas en los soportes de pequeño tamaño y que es el que se tenía disponible en ese momento. Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente sección.

4.4.5 Empleo del modelo PLS-ATR-MIR en el análisis de pasta de papel impregnado

Para evaluar la posibilidad de aplicar el método desarrollado para tejidos impregnados a otras matrices diferentes a las de tejido de fieltro blanco o negro, se midió por ambas caras una hoja de pasta de papel de 6 x 4 cm² que, estaba impregnada en cocaína. En total se obtuvieron 12 medidas en puntos diferentes de la superficie de cada una de las caras dos caras del soporte obteniendo, por tanto, un total de 24 espectros ATR-MIR.

En la **Figura 69** se indican los espectros ATR-MIR de un mismo punto pero en las dos caras de la lámina impregnada, pudiéndose observar que ambos espectros son muy parecidos; lo que indicaría que la impregnación por ambas caras es similar. Si se comparan estos espectros con los del patrón de cocaína clorhidrato, se ve que, al igual que en el caso de los fieltros impregnados, las principales bandas que aparecen corresponden con las de la cocaína clorhidrato, lo que hace pensar que no deberían producirse interferencias para la cuantificación de la cocaína presente debidas al soporte de la muestra.

Se aplicó a las muestras impregnadas el test cualitativo ATR-MIR desarrollado previamente para la determinación de cocaína y de sus posibles adulterantes en muestras sólidas y se concluyó que los dos primeros resultados para la comparación con la biblioteca fueron los correspondientes a una muestra de cocaína sin adulterar y a patrón de cocaína clorhidrato, con una calidad de *hit* de 762 y 754 respectivamente, considerando un punto al azar de la muestra. La aplicación del test en los diferentes puntos de medida no produce variación en los resultados obtenidos, de manera que se obtienen valores de *hit* del mismo orden, independientemente del punto considerado. Los test de identidad fueron negativos para todos los adulterantes considerados en el estudio. Por tanto, nos encontramos con una muestra problema de pasta de papel impregnada con cocaína que no presenta ninguno de los adulterantes esperados.

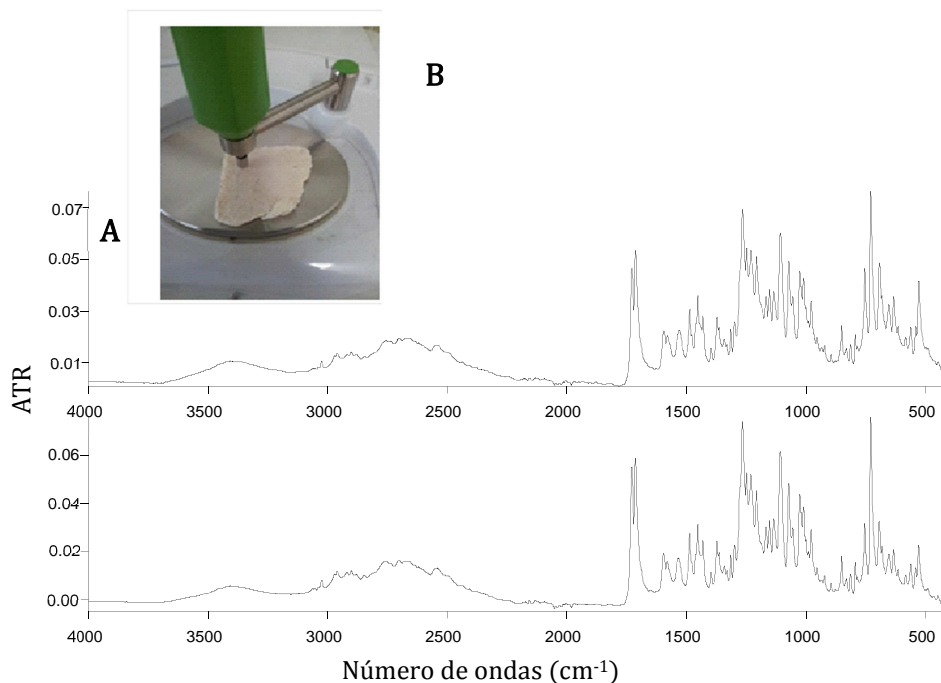


Figura 69. A. Espectros ATR-MIR de una hoja de pasta de papel impregnada con cocaína, obtenidos en ambas caras de un mismo punto de medida. B. Detalle del modo de medida.

Se realizó un estudio PCA de los espectros obtenidos junto con las muestras de fieltro impregnado utilizadas para la construcción del modelo PLS-ATR-MIR. En el gráfico de *scores* PC₂ vs PC₁ (**Figura 70**) se puede observar que los espectros de pasta de papel impregnada aparecen agrupados y próximos al conjunto de los soportes de fieltro blanco impregnados (concretamente a la muestra que contenía un 38.1 % (p/p) de cocaína base), presentando además una baja dispersión. Esto indicaría que el método PLS-ATR-MIR desarrollado para las telas impregnadas podría resultar adecuado para el análisis de las muestras de pasta de papel. Además, la proximidad de los puntos en el gráfico de los *scores* supondría que la impregnación de la matriz es considerablemente homogénea y bastante parecida para ambas caras del soporte.

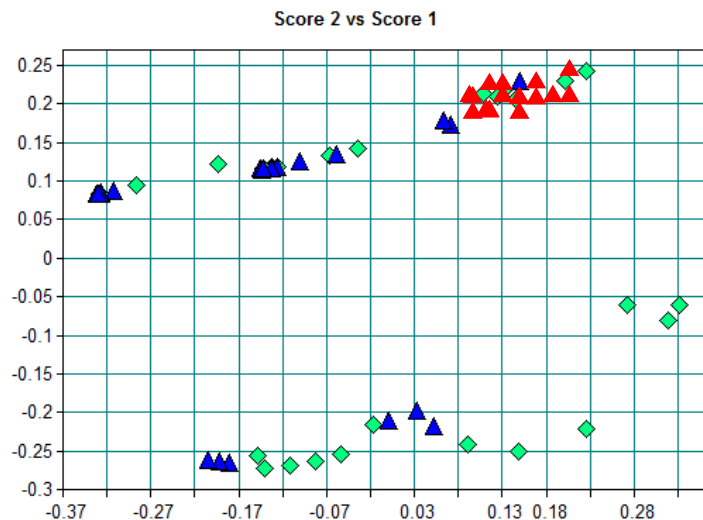


Figura 70. Representación de las medidas de la pasta de papel impregnada en el gráfico de *scores* PC_2 vs PC_1 de las muestras de calibración y validación del modelo PLS-ATR-MIR. Nota: ◆ muestras de calibración, ▲ muestras de validación, ▲ lámina de pasta de papel impregnada.

Los espectros de la pasta de papel impregnada se procesaron con el modelo PLS-ATR-MIR (ver detalles del mismo en la **Tabla 39**) y los resultados obtenidos para cada uno de los puntos de medida se indican en la **Tabla 42**. Los valores promedio obtenidos para ambas caras resultaron comparables entre sí y con el valor de referencia obtenido en el análisis por GC-FID. Por lo tanto, se puede confirmar que tal como indicaba el estudio PCA, el método PLS-ATR-MIR empleando modelos construidos a partir de tejidos impregnados resulta adecuado para la cuantificación de cocaína en muestras de pasta de papel. Tal como se había supuesto a partir del gráfico de los *scores*, la precisión de los resultados individuales obtenidos en las medidas de cada una de las caras del soporte confirma que la impregnación es bastante homogénea para toda la lámina.

Tabla 42. Resultados obtenidos para el análisis PLS-ATR-MIR de cocaína en una lámina de pasta de papel impregnada y comparación estadística de los mismos con el valor de referencia encontrado por GC-FID.

Punto de muestreo	Valor obtenido cocaína base, % (p/p)	Punto de muestreo	Valor obtenido cocaína base, % (p/p)
1	51.31	13	53.49
2	48.60	14	51.25
3	49.15	15	51.22
4	50.33	16	50.88
5	49.78	17	51.27
6	48.27	18	51.86
7	48.59	19	51.60
8	50.52	20	50.19
9	49.11	21	52.28
10	48.82	22	52.62
11	54.35	23	51.78
12	51.19	24	51.80
Cara A	50.0±1.5	Cara B	51.7±0.8
		Media total	50.8 ± 1.6 % (p/p)
		Valor de referencia	50.7±2.5 % (p/p)
		t_{cal}	0.211
		t_{tab}	2.05

En conclusión, los modelos de cuantificación mediante medidas ATR-MIR resultan adecuados cuando se presentan muestras como las que se han considerado en este apartado que presentan una impregnación homogénea aunque la matriz sea diferente. Por lo general, no es habitual encontrarse con muestras de impregnación no homogénea ya que la mayoría de materiales utilizados para este fin son telas de tipo fieltro como las que se han empleado en la construcción de los modelos PLS desarrollados, y normalmente la cocaína se ha depositado en las mismas mediante inmersión en una disolución concentrada y posterior secado del disolvente [47].

En la siguiente sección se presenta un ejemplo de los supuestos en los que la impregnación de las muestras no es tan homogénea.

4.4.6 Determinación de cocaína en muestras con impregnación no homogénea

El ejemplo estudiado en esta sección corresponde al decomiso de una especie de espuma de poliuretano impregnada con cocaína, de dimensiones 4 x 3 cm², en la que por el aspecto que presenta se aprecia que la impregnación no resulta del todo homogénea. Como se ha indicado, esta falta de homogeneidad se aprecia a simple vista debido a las diferencias morfológicas y al tacto de ambas caras del material (ver detalle de la **Figura 71 A**).

A diferencia de los materiales impregnados considerados hasta ahora, que presentaban un grosor de aproximadamente 1-2 mm y una apariencia similar en ambas caras, esta muestra con aspecto de espuma presenta un grosor mucho mayor y esto podría suponer que la cocaína quedara impregnada también en el interior al que no es posible acceder con la sonda para realizar la medida sin llevar a cabo un corte seccional. Además la diferencia entre una y otra cara del material es evidente a simple vista. Mientras una cara presenta un tono gris y la impregnación de cocaína resulta muy evidente, la otra cara es de un tono rosado y parece que la cocaína haya penetrado más en su interior. Esto podría deberse a que el proceso de impregnación se hubiera realizado por absorción a través de una de las caras de la espuma de una disolución concentrada de cocaína y posterior eliminación del disolvente por secado.

En la **Figura 71 B** se muestran espectros ATR-MIR de ambas caras de la espuma impregnada. A partir de ellos se evidencia, de forma manifiesta, la existencia de claras diferencias entre ambos lados, lo que sugiere que el contenido en cocaína será también distinto para cada una de las caras de la muestra.

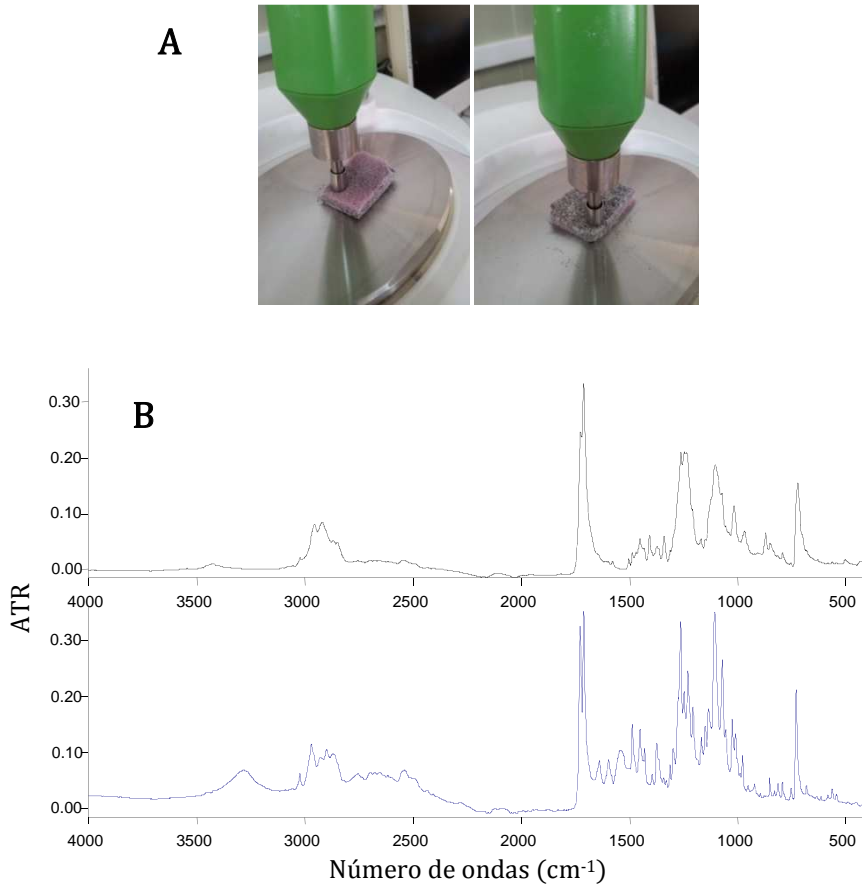


Figura 71. A. Detalle de la medida de las muestras de espuma por las dos caras en el que puede apreciarse las diferencias morfológicas entre ambas. B. Espectros ATR-MIR obtenidos de ambas caras de la muestra de la espuma impregnada en cocaína.

Se realizó un estudio PCA con los espectros problema y se compararon los de las telas utilizadas para la construcción del modelo PLS-ATR-MIR y en la representación gráfica de los *scores* PC_2 vs PC_1 (**Figura 72**) se observa que aparece una diferencia y una clara dispersión de las medidas para cada una de las caras de la espuma impregnada con cocaína. Mientras que los espectros correspondientes a la cara A quedan agrupados junto con los de las telas de fieltro impregnadas, el resto forman un grupo nuevo de espectros que presenta, a su vez, una mayor dispersión. Esto hace prever que la impregnación de ambas caras de la espuma pueda ser claramente diferente.

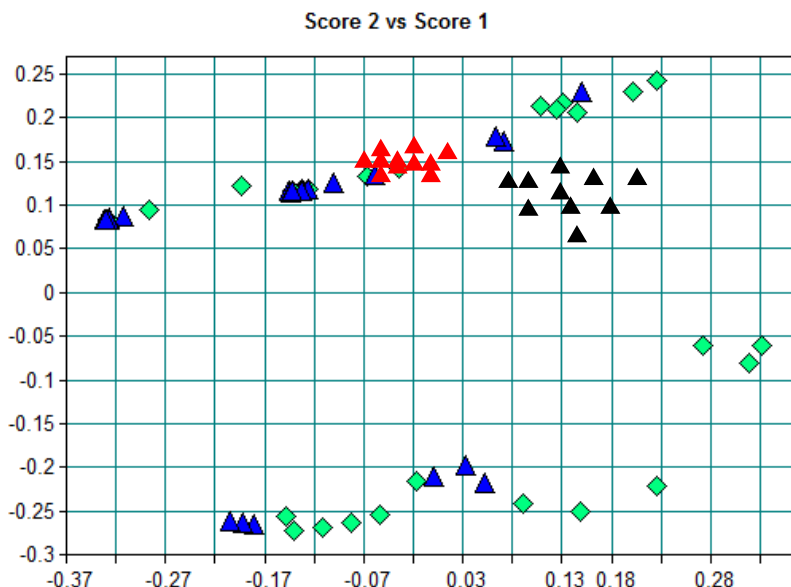


Figura 72. Representación de las medidas ATR-MIR de la espuma impregnada en el gráfico de *scores* PC_2 vs PC_1 de las muestras de calibración y validación del modelo PLS-ATR-MIR. Nota: \blacklozenge muestras de calibración, \blacktriangle muestras de validación, \blacktriangle cara de la espuma con impregnación homogénea, \blacktriangle cara de la espuma con impregnación no homogénea.

Se aplicó el test cualitativo ATR-MIR para la identificación de cocaína y sus posibles adulterantes, obteniéndose los resultados que se comentan a continuación. Para la cara que por sus características externas y los resultados del estudio PCA se espera que presente una impregnación homogénea, en la comparación con la biblioteca el primer resultado obtenido fue el correspondiente a una muestra de cocaína sin adulterar, mientras que el segundo se atribuía a una mezcla de cocaína y levamisol, con una calidad de *hit* del mismo orden para los diferentes puntos de medida. El test de conformidad resultó negativo para todos los adulterantes esperados. Sin embargo, en el caso de la cara con impregnación no homogénea el resultado de la identificación variaba en función del punto de medida considerado. A modo de ejemplo, en la **Tabla 43** se indican los resultados obtenidos para tres puntos al azar de cada una de las caras del material impregnado, pudiéndose ver la variabilidad obtenida para una de las caras.

Tabla 43. Resultados del test de identidad para diferentes puntos de una espuma de poliuretano impregnada con cocaína.

<u>Cara/Punto de medida</u>	<u>(hit) Resultado de la biblioteca</u>	<u>Resultado del test de identidad para adulterantes</u>
1/1	(808) Muestra de cocaína sin adulterar (749) Mezcla de cocaína y levamisol	Negativo para todos los adulterantes.
1/2	(798) Muestra de cocaína sin adulterar (723) Mezcla de cocaína y levamisol	Negativo para todos los adulterantes.
1/3	(895) Muestra de cocaína sin adulterar (768) Mezcla de cocaína y levamisol	Negativo para todos los adulterantes.
2/1	(132) Mezcla con cafeína, tetracaína y procaína (130) Mezcla con levamisol y cafeína	La calidad de hit no es suficiente para la aplicación del test.
2/2	(748) Cocaína sin adulterar (706) Cocaína mezclada con levamisol.	Negativo para todos los adulterantes.
2/3	(456) Cocaína sin adulterar (418) Cocaína mezclada con levamisol	La calidad de hit no es suficiente para la aplicación del test.

Nota: Cara 1 corresponde a la cara de impregnación homogénea, mientras que Cara 2 es la no homogénea.

Como se puede observar, los valores para los puntos de medida en la cara de impregnación homogénea son del mismo orden y permitirían la aplicación del test cualitativo ATR-MIR, donde se había establecido un valor de corte para la calidad de *hit* de 500. En el caso de los puntos de medida de la cara no homogénea de la espuma, en algunos de ellos el valor de calidad de hit obtenido se considera demasiado bajo para aplicar el test ATR-MIR, poniendo de manifiesto nuevamente, tal como se había visto en el estudio PCA, la falta de homogeneidad de la impregnación del material y la dificultad de aplicar un procedimiento de medida ATR-MIR en estas circunstancias.

Los espectros de ambas caras de la espuma se analizaron con el modelo PLS-ATR-MIR para cuantificar la cantidad de cocaína presente y los resultados obtenidos se indican en la **Tabla 44**. La predicción de los valores con el método

PLS-ATR-MIR indica que la impregnación por ambas caras es claramente distinta. En el caso de la cara A los valores presentaban una dispersión por debajo del 2 %, similar a la obtenida para las telas o la lámina de pasta de papel impregnada, lo que confirma que podría considerarse que la impregnación es bastante homogénea y comparable con la de los soportes anteriores, tal como cabía esperar a partir del gráfico PCA. Para la cara B los valores obtenidos presentaban una gran dispersión, obteniéndose en algún caso resultados negativos, carentes de sentido. Esto indica que tan sólo podrían utilizarse las medidas de una de las caras para la cuantificación de la cocaína con una precisión adecuada. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en el test cualitativo ATR-MIR donde obteníamos diferentes valores de calidad de *hit* para los diferentes puntos de la espuma.

Tabla 44. Resultados obtenidos en el análisis de una muestra de espuma impregnada utilizando el modelo PLS-ATR-MIR construido para telas impregnadas.

Medida	Cara A	Cara B
1	51.63	10.66
2	51.97	< 0
3	50.63	41.10
4	49.84	< 0
5	51.79	62.41
6	50.49	11.68
7	50.99	13.63
8	49.10	16.80
9	51.94	60.41
Media	50.9	31
s	0.9	23
RSD (%)	1.9 %	75 %
Valor de referencia	68.1±2.2 % (p/p)(n=3)	

Por lo que respecta a la exactitud, si se compara el resultado obtenido para la cara A con el correspondiente al análisis de la muestra por el método de

referencia GC-FID, tras la extracción de la cocaína absorbida, se comprueba que los valores no son coincidentes; además es de destacar que el valor obtenido por PLS-ATR-MIR es significativamente inferior al de referencia. Ello podría deberse a las diferencias existentes entre las matrices de tela y de espuma, mientras que la tela de fieltro es de un espesor aproximado de 1-2 mm y da lugar a una distribución bastante homogénea de la cocaína en todo su volumen, la espuma tiene un espesor aproximado de 5 mm, lo cual, como ya se ha comentado, puede provocar que la cocaína se introduzca de forma preferente en su interior. Además hay que tener en cuenta que para el registro de los espectros ATR-MIR la muestra se presiona sobre el cristal del accesorio ATR utilizando la prensa de que dispone y que está dotada de un sensor que mide la presión ejercida; el hecho que la matriz sea espuma frente a una tela más fina y compacta puede suponer que la presión final ejercida sobre la interfase cristal/muestra no sea la misma y, en consecuencia, que la absorbancia IR de las bandas del espectro presenten intensidad distintas en función del ángulo de contacto.

En conclusión, para el caso del análisis de espumas impregnadas, las medidas ATR-MIR únicamente tendrían utilidad como técnica de *screening* que permita establecer de forma rápida la posible presencia de cocaína, el nivel de concentración y el grado de homogeneidad/heterogeneidad en la distribución de la misma en este tipo de muestras. La información proporcionada por estas medidas ATR-MIR resultaría de utilidad para establecer la estrategia de muestreo más adecuada en función de las características de las muestras, con objeto de aplicar de forma correcta un método de referencia. La representación gráfica de los *scores* en el estudio PCA nos sirve para evaluar la capacidad de la técnica para predecir los valores de cocaína en los soportes impregnados. De manera que esta estrategia sólo sería adecuada, desde el punto de vista cuantitativo, cuando las muestras presenten impregnación homogénea por ambas caras y la textura/consistencia del material sea similar a la de los utilizados para la construcción de los modelos PLS. Cuando los criterios para el

uso de la técnica no se cumplen, ésta nos sirve para la confirmación de la presencia de cocaína como alternativa a otra de clase A (clasificación del SWGDRUG), como la espectrometría de masas, y pueden obtenerse resultados confirmatorios de forma rápida con la ventaja de que no se requiere de la extracción previa de la cocaína del soporte, que la medida es directa y que se trata de una técnica no destructiva.

4.5 Determinación de cocaína en disoluciones acuosas por ATR-MIR

Otra forma de introducción de cocaína que va cobrando más fuerza entre las organizaciones que se dedican al tráfico de drogas es el de su disolución en diferentes matrices líquidas. Es por ello que esta parte de la Tesis Doctoral se dedicará al estudio de muestras líquidas sospechosas de contener cocaína. Para ello se consideró el estudio de una aprehensión de cocaína camuflada en forma de 53 botellas de un litro de capacidad que simulaban vinagres de fruta. A simple vista, las botellas se presentaban etiquetadas como vinagres de fruta de diferentes sabores (fresa, uva, mora, piña, melón y durazno) pero una consideración más detallada de su contenido permitió comprobar que en algunas de ellas se apreciaba una separación en dos fases líquidas mientras que en el resto la disolución resultaba totalmente homogénea y transparente. Esta aparente separación de las fases se veía bastante afectada por la temperatura (si las muestras enfriaban en nevera, la separación resultaba más evidente). Como no se podía establecer una correlación entre el etiquetado y el contenido de la botella no se pudo plantear un muestreo representativo y se tuvo que proceder a analizar e identificar el contenido de todas las botellas. En esta sección se plantea la identificación de las muestras positivas y negativas mediante un test de conformidad a partir de sus espectros ATR-MIR y la posterior cuantificación de las muestras positivas empleando un modelo PLS-ATR-MIR construido utilizando para la calibración patrones acuosos de cocaína a diferentes niveles de concentración, todo ello como alternativa a los métodos de referencia por GC-MS y GC-FID ya vistos en la Parte Experimental.

Las 53 muestras de supuestos vinagres de fruta, sospechosas de contener cocaína disuelta se analizaron por el procedimiento de referencia GC-MS y se detectó cocaína en 31 de ellas en las que, tal como se ha comentado anteriormente, se observaba una cierta separación de fases (ver detalle de la

Figura 73). Las muestras positivas se analizaron por el método de referencia GC-FID y en la **Tabla 45** se indican los contenidos obtenidos para cada una de ellas.

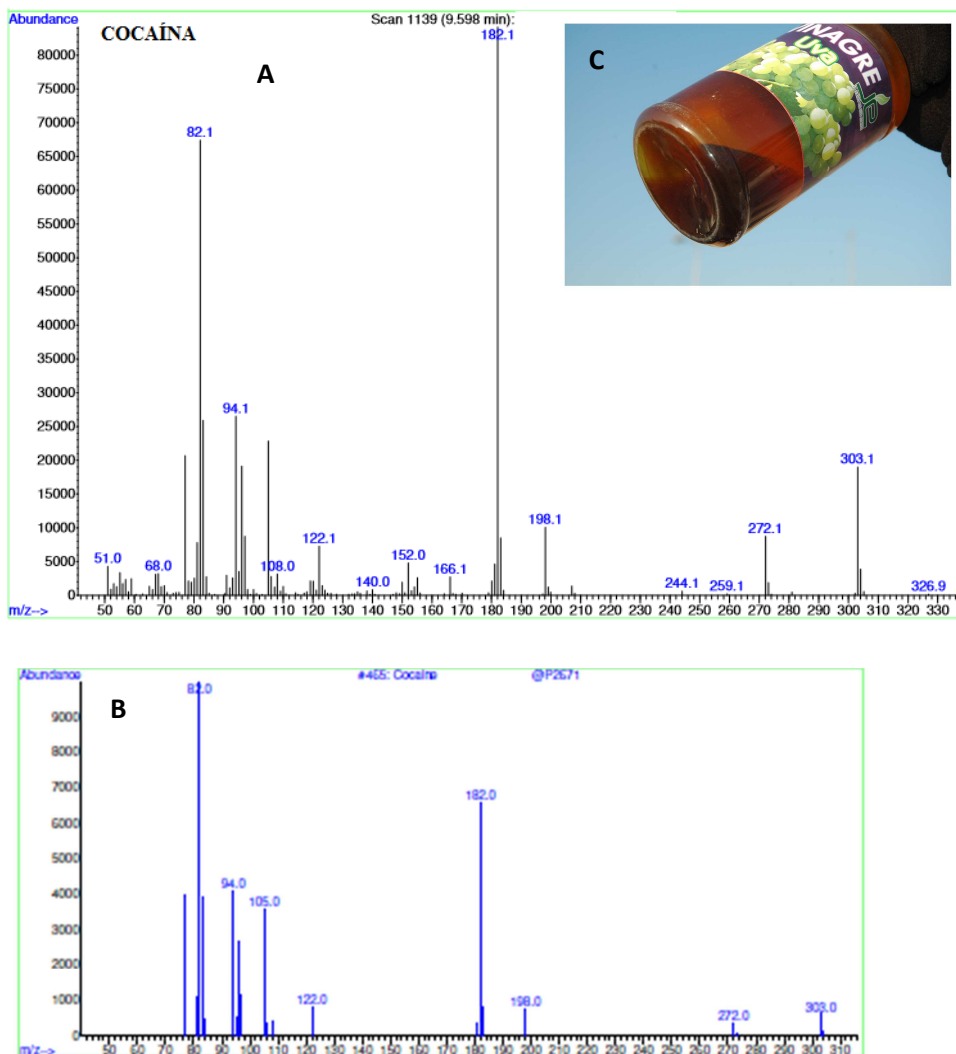


Figura 73.A. Espectro de masas del pico de cocaína detectado en la muestra sospechosa. B. Espectro de cocaína obtenido de la biblioteca de espectros. C. Detalle en el que se aprecia la separación de fases que se produce al enfriar las botellas con resultado positivo de cocaína.

Tabla 45. Contenidos de cocaína encontrados en las muestras de vinagre de fruta por el método de referencia GC-FID.

Muestra	Valor de referencia cocaína base, % (p/p)	Muestra	Valor de referencia cocaína base, % (p/p)
1	15.06	17	16.76
2	15.66	18	15.74
3	17.18	19	14.74
4	17.30	20	16.52
5	14.79	21	16.68
6	15.45	22	15.78
7	15.61	23	15.42
8	16.19	24	14.97
9	17.96	25	17.34
10	15.96	26	14.21
11	16.80	27	12.40
12	17.69	28	13.38
13	16.16	29	14.11
14	14.57	30	15.85
15	16.60	31	17.92
16	14.95		

4.5.1 Espectros ATR-MIR

Para la identificación y análisis de las muestras de cocaína en disolución se prepararon disoluciones patrón de cocaína a diferentes concentraciones y se obtuvieron sus respectivos espectros ATR-MIR. En la **Figura 74** se indican los espectros ATR frente a un *background* de la celda vacía, correspondientes a un blanco de agua y tres disoluciones patrón al 5 %, 10 % y 20 % p/p en la que se pueden apreciar las bandas características de la cocaína. Puede verse también el detalle de la región entre 1700-950 cm^{-1} y su variación de intensidad en función de la concentración de cocaína en cada patrón.

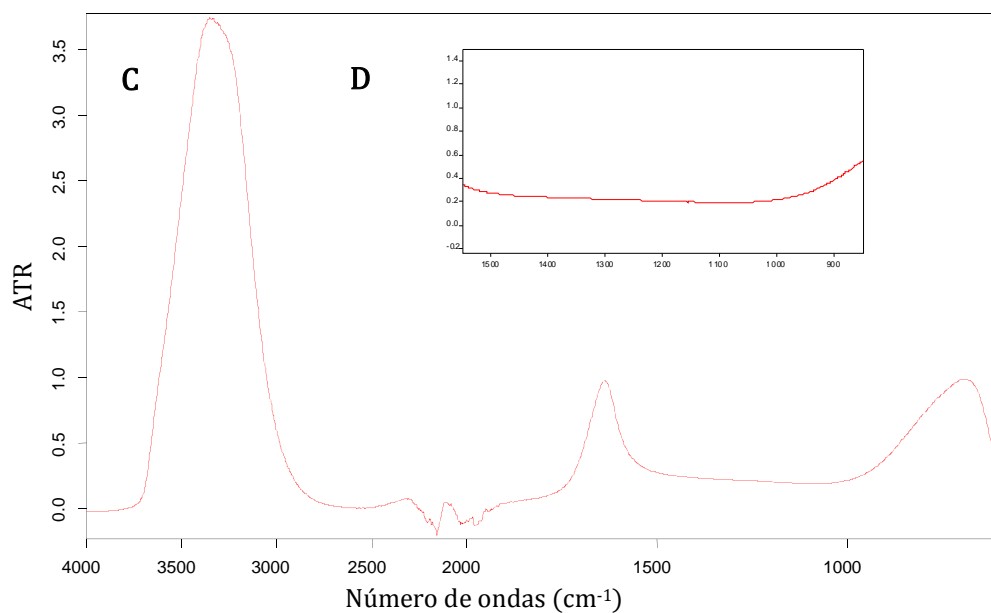
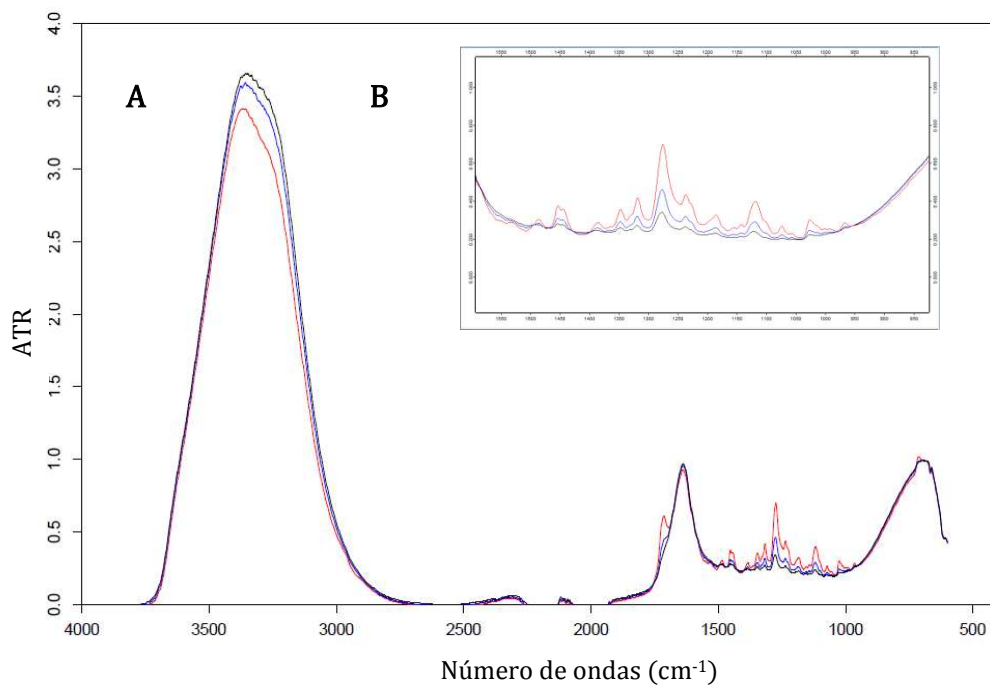


Figura 74. Espectros ATR-MIR de disoluciones acuosas de cocaína y de un blanco de agua. A. Patrones de cocaína en disolución al 5, 10 y 20 % (p/p). B. Detalle de la zona del espectro entre 1550 y 850 cm⁻¹. C. Blanco de agua. D. Detalle de la zona del espectro entre 1550 y 850 cm⁻¹ para un blanco de agua.

Tal como se ha comentado, dado que las muestras positivas presentan una separación de fases, para caracterizar dichas fases se registraron los espectros de cada una de ellas por separado así como el de la fase homogeneizada tras agitación manual. En la **Figura 75** se puede apreciar que en la fase inferior de la muestra antes de la agitación las bandas de cocaína, que aparecen en la región de 1550 a 850 cm^{-1} , son mucho más intensas que las observadas en la fase superior y que en la muestra homogeneizada. Esto confirma que la diferencia de fases en las muestras se debe a la presencia de diferentes cantidades de cocaína en disolución. Este comportamiento de separación de fases y diferentes niveles de cocaína en las mismas podría indicar que no se trata únicamente de una fase acuosa y que podría estar presente algún otro disolvente relativamente miscible con el agua.

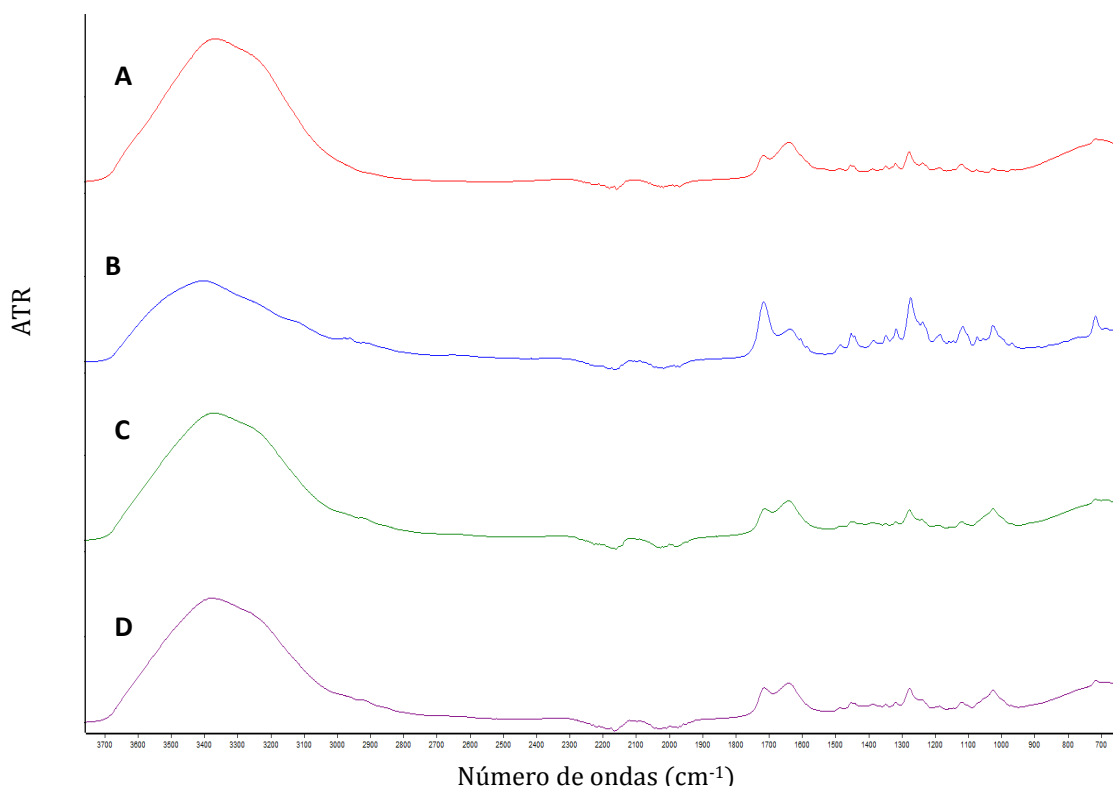


Figura 75. Espectros ATR-MIR de muestras de vinagres de frutas conteniendo cocaína. A. Patrón acuoso de cocaína al 20 % p/p. B. Espectro de la fase inferior de una muestra positiva. C. Espectro de la fase superior de una muestra positiva. D. Espectro de la muestra homogeneizada.

Se registraron los espectros ATR-MIR de las muestras problema, por triplicado tras agitación manual. En la **Figura 76** se pueden ver los espectros ATR-MIR, en la región donde se presentan las bandas de la cocaína, de un blanco de agua, una muestra positiva y una negativa. Si se comparan los espectros de una muestra positiva y una negativa se aprecian claramente las diferencias en la zona en que aparecen las bandas que corresponden a la cocaína.

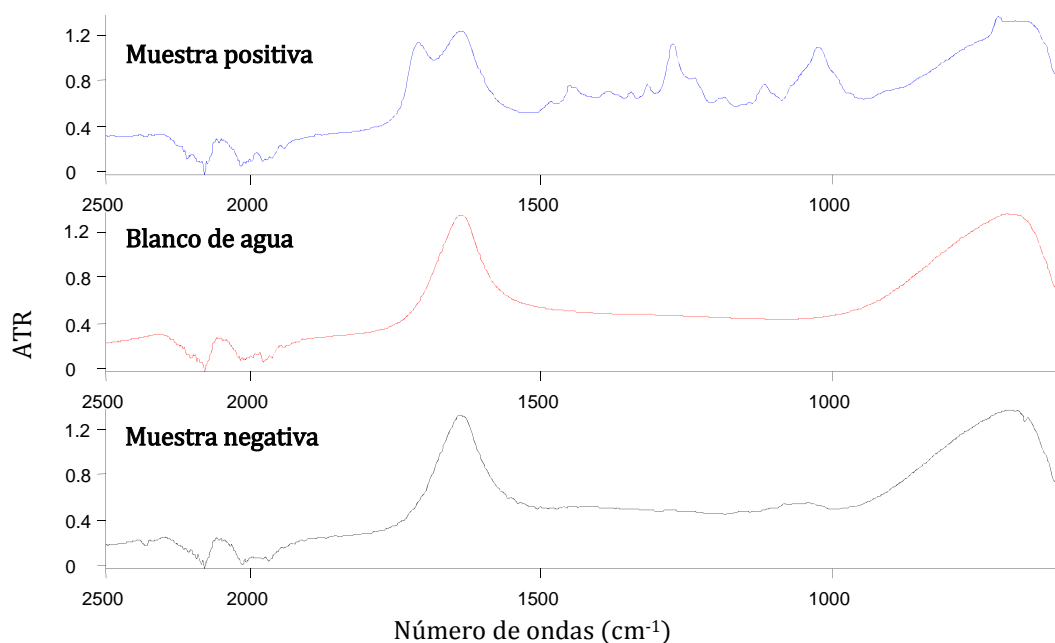


Figura 76. Espectro ATR-MIR de una muestra de vinagre positiva a cocaína, un blanco de agua y una muestra de vinagre negativa a cocaína en la región de 600 a 2500 cm⁻¹.

4.5.2 Análisis *cluster* (HCA) de los espectros obtenidos para los vinagres de frutas

Como ya se ha comentado, la presencia o ausencia de dos fases y por tanto de cocaína no se puede relacionar con el aspecto externo de las botellas, ya que vienen etiquetadas haciendo referencia a diferentes sabores de frutas, por lo que no existe relación entre el sabor y el contenido en cocaína. Se procedió a realizar un estudio HCA a partir de los espectros ATR-MIR de las muestras, de los patrones acuosos de cocaína y de blancos de agua para detectar pautas entre las diferentes muestras. Para ello se eligió la zona del espectro en se observan las bandas de la cocaína y se seleccionó la región de 1491 a 942 cm^{-1} , probando diferentes pre-tratamientos y finalmente seleccionando la opción de primera derivada combinada con normalización vectorial. En dichas condiciones se obtuvo el dendrograma de la **Figura 77A** en el que claramente se diferencian dos grupos que corresponden a muestras positivas y negativas. Observando únicamente las muestras que contienen cocaína (**Figura 77B**) y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis del contenido de cocaína por el método de referencia GC-FID, se aprecia que existen tres grupos, que podrían asignarse a lotes o partidas que difieren en la concentración media en cocaína base, que son aproximadamente del 15.0, 16.5 y 17.5 % (p/p), respectivamente.

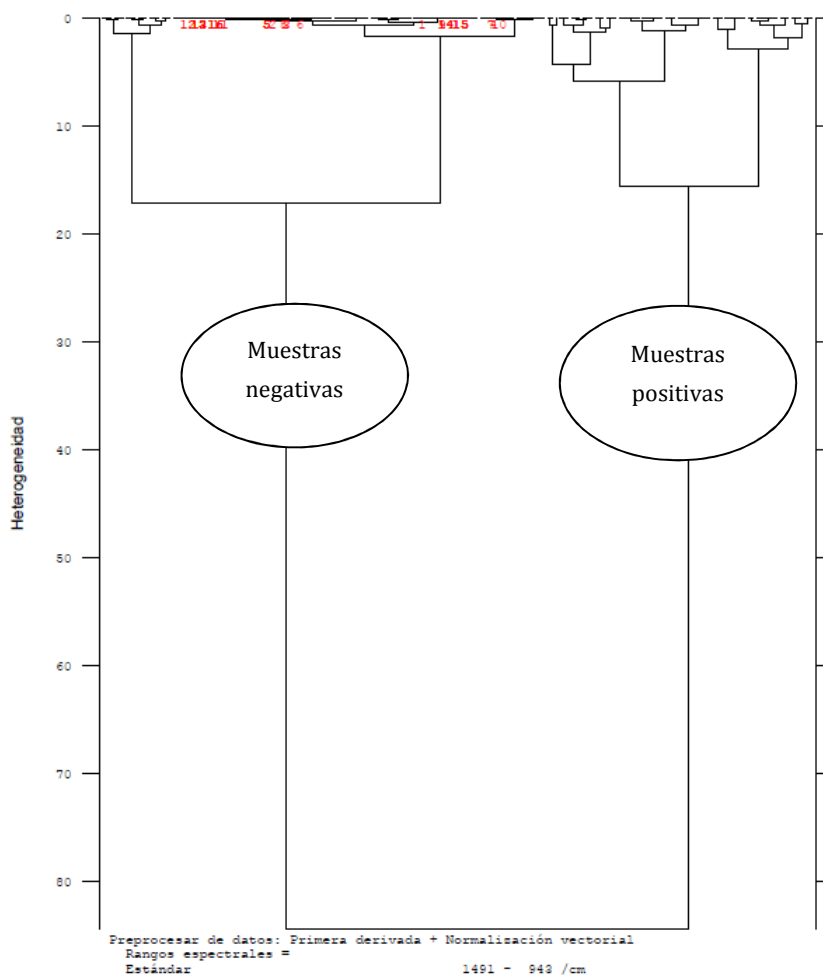


Figura 77A. Dendrograma obtenido en el HCA de las muestras de supuestos vinagres. Condiciones: algoritmo de Ward considerando la distancia Euclídea, empleando la primera derivada + normalización vectorial de los datos espectrales correspondientes a las regiones de 942 a 1491 cm⁻¹.

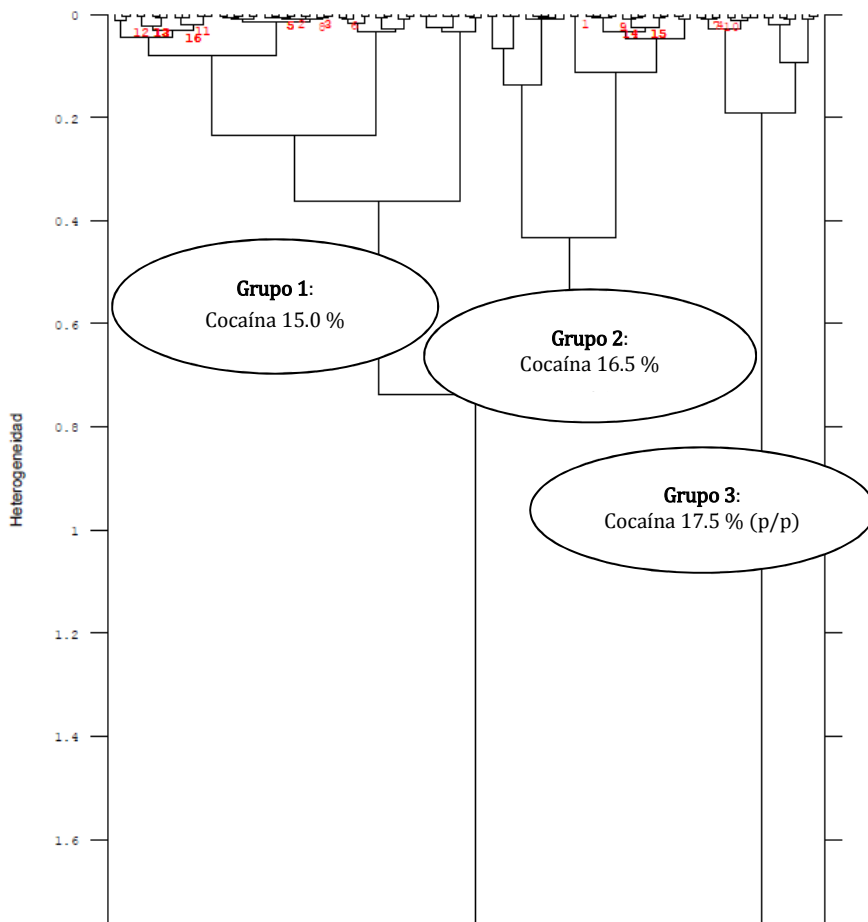


Figura 77 B. Detalle de la distribución de las muestras positivas de vinagre conteniendo cocaína en el dendrograma obtenido a partir de los espectros ATR-MIR. Condiciones: Las indicadas en la figura 77A.

Si se realiza una representación gráfica de los valores obtenidos para las muestras por el procedimiento de referencia en función del grupo asignado por el HCA se aprecia claramente la división de las muestras en los tres lotes según su contenido medio en cocaína (**Figura 78**), lo que podría indicar que se trata de tres remesas posiblemente preparadas por separado. Por otra parte, no se ha encontrado una correlación clara entre un determinado sabor del vinagre y la presencia de cocaína en la muestra correspondiente.

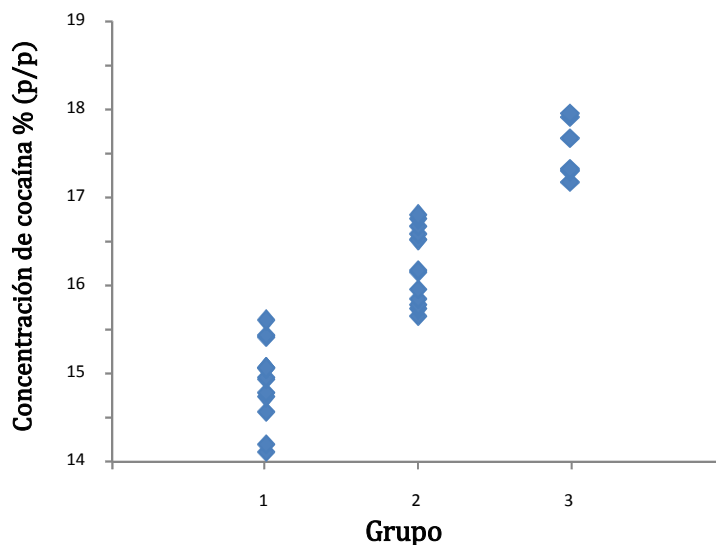


Figura 78. Distribución en grupos de las muestras de vinagre positivas en cocaína en función de la concentración y del HCA.

4.5.3 Test de conformidad para el análisis cualitativo de cocaína disuelta

Para el análisis cualitativo de las muestras se empleó un test de conformidad (*ident*) con el software OPUS 6.5 que permitió clasificar las muestras en positivas o negativas. Como espectros de referencia se utilizaron blancos de agua y patrones de cocaína preparados en concentraciones de 5, 10 y 20 % (p/p). Utilizando la misma región y tratamiento previo del espectro que el considerado para el HCA se aplicó el test de conformidad que permitió clasificar las muestras como positivas o negativas, en función de la presencia o no de cocaína en las mismas. En la **Figura 79** se puede ver, a modo de ejemplo, los resultados del test de conformidad, usando el método desarrollado con la opción *ident*, correspondientes a una muestra positiva y una negativa. Cabe destacar que tanto la selectividad, la especificidad y la eficiencia que se alcanzan para el conjunto de muestras considerado resultaron ser del 100 %, no detectándose ni falsos positivos ni falsos negativos. Esto evidencia, una vez más,

la adecuación del procedimiento ATR-MIR propuesto como método de *screening* para clasificar las muestras de cocaína en disolución acuosa.

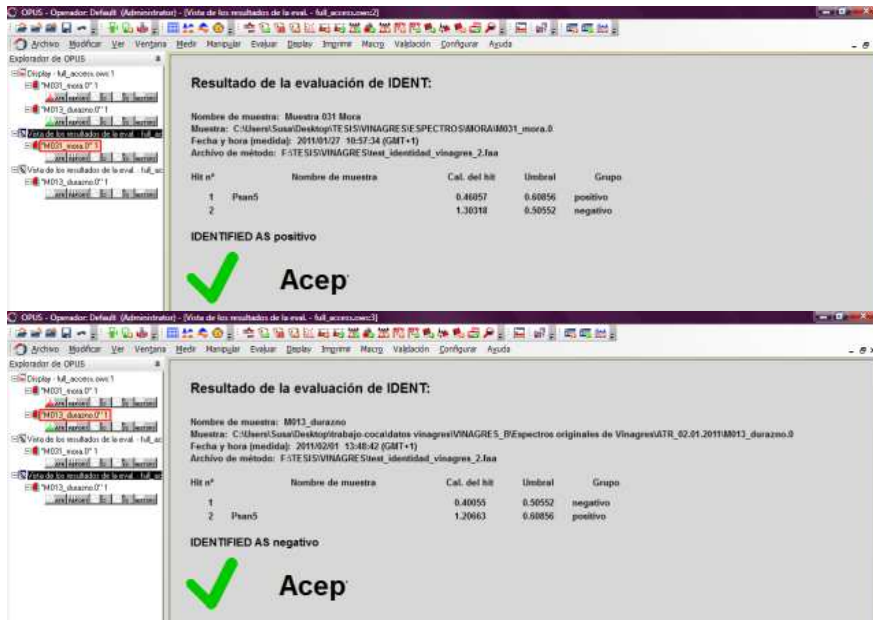


Figura 79. Ejemplos de las pantallas de resultado para el test de conformidad sobre la presencia de cocaína correspondiente a una muestra positiva y una negativa de vinagre de frutas.

4.5.4 Modelo PLS-ATR-MIR para la determinación cuantitativa de cocaína disuelta

Una vez verificada la adecuación de las medidas ATR-MIR para llevar a cabo la identificación de cocaína camuflada en disoluciones acuosas, se estudió la posibilidad de obtener información cuantitativa mediante el empleo de la calibración PLS. Con este fin se construyó un modelo PLS a partir de un conjunto de calibración constituido por patrones acuosos de cocaína. Para ello se prepararon patrones con concentraciones de cocaína base de 4.67, 5.00, 8.97, 10.0, 15.87 y 20.0 % (p/p), así como un blanco de agua que se utilizaron para la modelización. En el conjunto de validación se introdujeron cinco muestras reales positivas (muestras de la 21 a la 25 de la **Tabla 45**) y tres negativas. Tanto al realizar la calibración como en la validación se trabajó con las réplicas

independientes de los espectros registrados por triplicado. Las muestras positivas se seleccionaron de manera que estuvieran presentes los tres grupos identificados en el HCA. Para la selección de las regiones espectrales en la construcción del modelo de calibración se tuvo en cuenta la región entre 1500 y 1000 cm^{-1} , que es donde aparecen la mayor parte de las bandas de la cocaína en las muestras positivas. A partir de aquí se acotó la región y se eligió el tratamiento previo de los datos espectrales para obtener un menor RMSECV y posteriormente se optimizó para obtener un modelo con mayor capacidad predictiva para las muestras incluidas en el conjunto de validación. En la **Tabla 46** se indican los parámetros del modelo PLS-ATR-MIR seleccionado. Sin necesidad de utilizar muestras reales para la calibración, ya que se emplearon patrones preparados y blancos de agua, con un pre-tratamiento de segunda derivada y considerando únicamente un solo factor, se obtuvo un modelo con una muy buena capacidad predictiva para las muestras del conjunto de validación con un RMSEP de 0.39 % (p/p) y un RPD de 22.

Tabla 46. Parámetros del modelo PLS-ATR-MIR para el análisis de cocaína en disolución.

PARÁMETROS DEL MODELO PLS-ATR-MIR	
Modo de medida	ATR-MIR
Regiones del espectro (cm^{-1})	1392.5-1303.8 1182.3-1116.7
Pre-procesado	Segunda derivada
Factores	1
R ² (%)	99.94
RMSEE (% p/p)	0.18
RMSECV (% p/p)	0.18
RMSEP (% p/p)	0.39
RPD	22.0

En la **Figura 80** se puede ver la representación gráfica de los valores de concentración de cocaína obtenidos frente a los de referencia empleando el modelo PLS-ATR-MIR para las muestras y los patrones, tanto para la calibración,

la validación cruzada y la predicción. En el caso de la calibración el coeficiente de determinación obtenido fue de un 99.94 %, muy similar al de la validación cruzada y al de validación del conjunto de test, que resultan ser de 99.93 % y 99.74 % respectivamente.

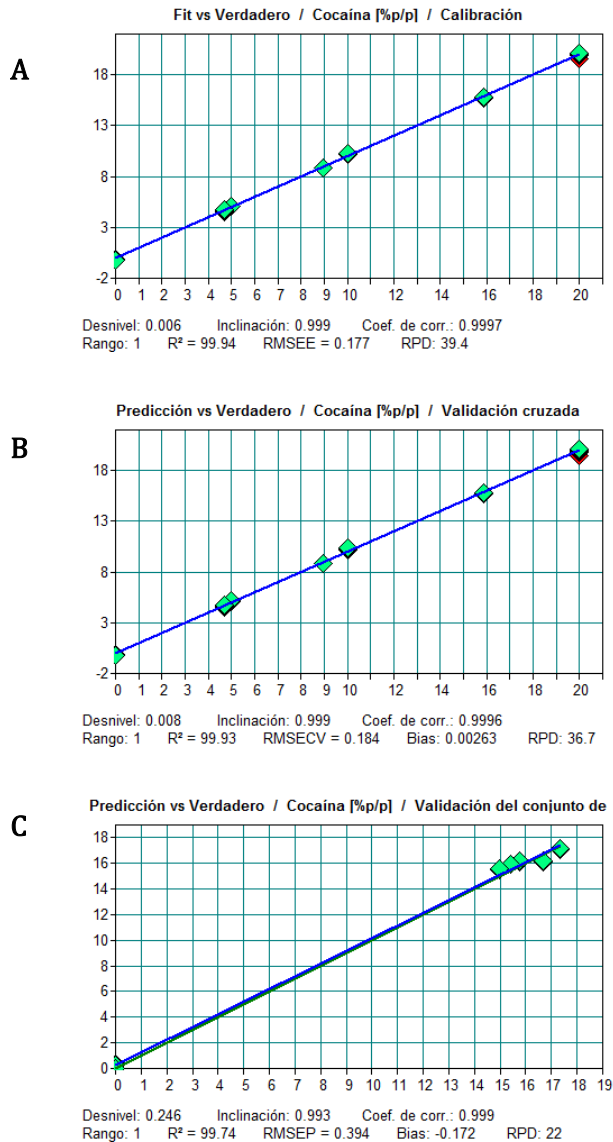


Figura 80. Gráficos de los valores predichos del modelo PLS-ATR-MIR para las muestras de cocaína en disolución. A. Calibración. B. Validación cruzada. C. Validación del conjunto test.

En el estudio HCA se comprobó cómo se encontraban tres lotes en función de la concentración de cocaína disuelta. Realizamos ahora un estudio PCA para comprobar si se conserva esta pauta y si se pueden establecer similitudes entre las muestras negativas etiquetadas con diferentes sabores de frutas o entre las muestras positivas y los patrones. Para ello utilizamos las condiciones empleadas en la calibración PLS. Los resultados obtenidos se pueden ver en la **Figura 81**. Como se puede apreciar en la **Figura 81A**, los espectros de los patrones quedan clasificados en función de la concentración de cocaína y separados de las muestras reales, ordenados de mayor a menor concentración de cocaína de izquierda a derecha en el gráfico de *scores* PC_2 vs PC_1 . Tanto las muestras negativas como el blanco de agua quedan agrupadas. Esto nos indica, como ya se ha comentado que las muestras positivas presentan además de agua, algún disolvente relativamente miscible con el agua que le confiera a la muestra unas características diferentes. En la **Figura 81B**, se aprecia el gráfico de *scores* PC_2 vs PC_1 del estudio PCA una vez introducidas las muestras problema, tanto positivas como negativas y se observa como las muestras negativas se agrupan todas alrededor del blanco de agua. En el caso de las muestras positivas y tal como se había visto en el HCA, se forman los tres grupos de muestras en función de la concentración de cocaína presente, de izquierda a derecha del gráfico de mayor a menor concentración, que corresponde a concentraciones medias de cocaína de 15.0, 16.5 y 17.5 % p/p. En la **Figura 81C** se puede ver el detalle de la zona del gráfico donde se agrupan dichas muestras.

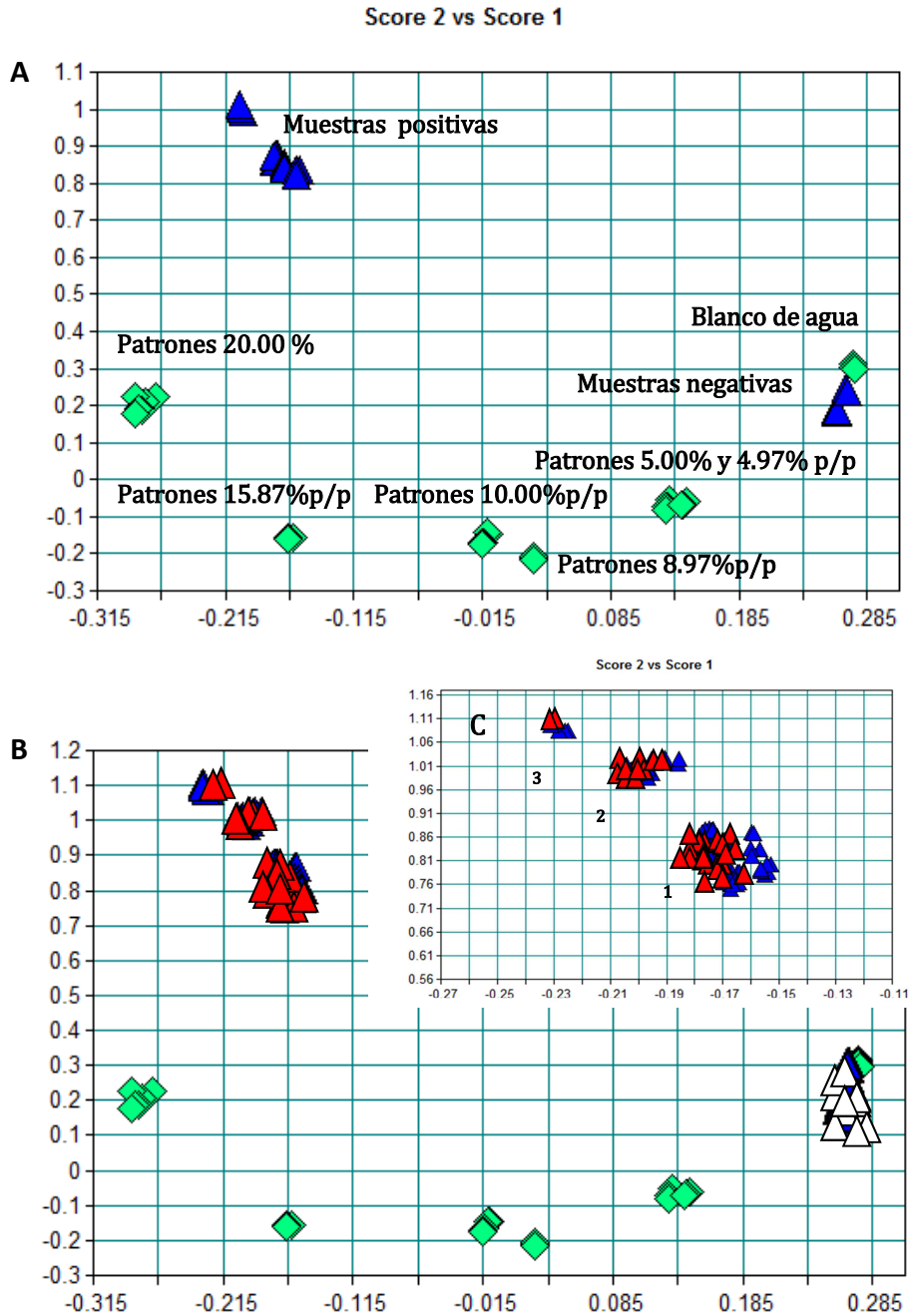


Figura 81. Estudio PCA de las muestras acuosas sospechosas de contener cocaína. A. Muestras utilizadas en los conjuntos de calibración y validación del modelo PLS. B. Total de muestras utilizadas en el estudio. C. Detalle de las muestras problema positivas. Nota: \blacklozenge muestras de calibración, \blacktriangle muestras de validación, \blacktriangle muestras positivas, \blacktriangle muestras negativas. 1. Muestras con concentración media de cocaína 15.0% p/p. 2. Muestras con concentración media de cocaína 16.5% p/p. Muestras con concentración media de cocaína 17.5% p/p.

4.5.5 Comparación de los resultados obtenidos con los encontrados por el método de referencia

Para la comparación de los resultados obtenidos por PLS-ATR-MIR en el análisis de muestras de vinagre de frutas con los del método de referencia se tomaron los espectros de las tres réplicas de las 26 muestras positivas que no se emplearon para la validación del modelo, se analizaron utilizando el modelo PLS-ATR-MIR indicado en la **Tabla 41** y se calculó el valor promedio con la correspondiente desviación estándar. Los resultados obtenidos se comparan con los del método de referencia aplicando, en este caso, un test t por parejas para la comparación de los mismos. No se optó por aplicar un test t de comparación de medias, ya que se disponía tan solo de una media de referencia para cada muestra y del estudio HCA se dedujo que las muestras pertenecían a lotes o partidas diferentes. Las muestras 26 a la 31 no se han tenido en cuenta para la comparación de los métodos, ya que al realizar el HCA con los parámetros especificados anteriormente, la clasificación de las muestras no correspondía con los valores obtenidos en la cuantificación. A continuación se explica el caso particular de cada una de estas muestras y por qué se han rechazado:

- Muestras 26, 27 y 28. Al realizar el estudio HCA quedaron clasificadas en el Grupo 1 de media 15.0 % (p/p). Los valores predichos por el modelo PLS también las situarían en ese grupo pero los valores de referencia obtenidos por GC-FID resultaron demasiado bajos y se consideró que pudo haber un problema en la cuantificación por dicho método, probablemente debido a una mala homogenización de las muestras.
- Muestras 29 y 31. En el HCA quedan clasificadas en el Grupo 2, de media 16.5% (p/p). Los valores obtenidos por el modelo PLS también las sitúan en el grupo 2. En el caso de la muestra 29 el valor de referencia GC-FID resulta demasiado bajo y como en el caso anterior se consideró

que podría haberse cometido un error en la homogenización de la misma para su análisis por CG-FID. Para la muestra 31, el valor de referencia resulta demasiado alto, lo cual también se podría explicar por una mala homogenización de la muestra.

- **Muestra 30.** Quedó clasificada en el Grupo 3, de media 17.5 % (p/p). En este caso el valor predicho por el modelo PLS-ATR-MIR coincidió con el grupo en el que se clasificó la muestra por HCA pero el valor obtenido por el método de referencia GC-FID resulta demasiado bajo y como en los casos anteriores se podría explicar por la falta de homogeneidad de la muestra.

Las incidencias anteriores señalarían las dificultades de analizar muestras cuyo comportamiento puede cambiar con la temperatura de almacenamiento, en especial, cuando se analizan por técnicas diferentes en momentos distintos.

Los resultados finales obtenidos se indican en la **Tabla 47**, donde las muestras rechazadas aparecen sombreadas. Si se aplica un test de datos emparejados excluyendo las muestras mencionadas, se concluye que ambos métodos no presentan diferencias estadísticamente significativas para la cuantificación de cocaína en disolución. Como se pudo ver, el HCA permite establecer la coherencia de los resultados obtenidos y rechazar aquellas muestras donde se pudo cometer algún error, consecuencia de una adecuada falta de homogeneidad de la misma a la hora de realizar los análisis.

En cuanto a la precisión obtenida en la predicción para las tres réplicas de las muestras problema, en todos los casos el RSD es inferior al 1 %, lo cual indica que el método PLS-ATR-MIR propuesto presenta características apropiadas de exactitud y precisión para la determinación de cocaína en disoluciones acuosas.

En conclusión, la combinación del test de conformidad y el modelo de regresión PLS-ATR-MIR proporcionó resultados comparables al método de referencia, permitiendo llevar a cabo el análisis de forma rápida y directa, sin la necesidad del empleo de reactivos ni disolventes, y con un mínimo consumo de muestra.

Tabla 47. Resultados obtenidos para las muestras problema de vinagre de frutas conteniendo cocaína analizadas por el método PLS-ATR-MIR comparados con los obtenidos por el método de referencia.

Muestra	Cocaína base % (p/p)		
	Valor de referencia	Valor PLS-ATR-MIR	diferencia
1	15.06	15.85±0.05	0.79
2	15.66	16.31±0.03	0.65
3	17.18	17.98±0.06	0.80
4	17.30	18.14±0.02	0.84
5	14.79	15.88±0.05	1.09
6	15.45	15.82±0.04	0.37
7	15.61	16.14±0.01	0.53
8	16.19	15.38±0.03	-0.81
9	17.96	17.02±0.02	-0.94
10	15.96	15.66±0.09	-0.30
11	16.80	15.56±0.02	-1.24
12	17.69	16.88±0.04	-0.81
13	16.16	16.07±0.07	-0.09
14	14.57	15.76±0.05	1.19
15	16.60	16.75±0.13	0.15
16	14.95	16.14±0.12	1.19
17	16.76	17.02±0.11	0.26
18	15.74	15.80±0.02	0.06
19	14.74	16.08±0.02	1.30
20	16.52	16.69±0.17	0.17
26	14.21	15.85±0.06	1.64
27	12.40	15.70±0.03	3.30
28	13.38	15.39±0.07	2.01
29	14.11	15.85±0.08	1.74
30	15.85	17.93±0.06	2.08
31	17.92	16.11±0.06	1.81
Promedio de las diferencias			-0.26
s			0.77
t_{cal}			1.51
t_{tab}			2.09

Nota: Los valores de las casillas sombreadas no se han considerado para la comparación estadística.

4.6 Caracterización de muestras de cocaína negra

En este apartado se va a considerar la caracterización por ATR-MIR de un conjunto de muestras de cocaína a las que se le ha añadido alguna sustancia con el objetivo de modificar su aspecto habitual de polvo blanco y enmascarar la reacción del tiocianato de cobalto que, como ya se ha mencionado, es la prueba presuntiva más utilizada por las unidades aprehensoras para la detección de cocaína. En concreto se han estudiado dos tipos de muestras en las que se detectó la presencia de cocaína después de analizarlas por cromatografía de gases: un conjunto de muestras decomisadas que simulaban ser café y una segunda muestra con aspecto de polvo compactado de color negro.

4.6.1 Muestras de cocaína con apariencia de café

En este caso se disponía de once paquetes de supuesto café molido procedentes de diferentes decomisos de los que se sospechaba que podían contener cocaína en su interior. El aspecto de la sustancia era similar al del café molido, tanto en su textura como en el color, si bien el olor era diferente al que cabría esperar.

En la muestra se podían apreciar pequeños gránulos de color marrón muy oscuro que hacían que no fuera del todo homogénea. Al realizar a estas muestras el test presuntivo de tiocianato de cobalto se obtuvo un resultado negativo aunque, por su procedencia y circunstancias en las que se produjo la incautación, existía una sospecha evidente de que no se trataba simplemente de café.

Se planteó la obtención de los espectros ATR-MIR como técnica de *screening* para la detección de cocaína en estas muestras sin necesidad de manipulación o preparación previa de las mismas. Para caracterizar y establecer las diferencias de las muestras sospechosas con muestras reales de café se obtuvieron los espectros ATR-MIR de las mismas así como de café molido de tueste natural. Se

realizó una sustracción de espectros y el resultado se comparó con el espectro de un patrón de cocaína clorhidrato. Como puede verse en la **Figura 82**, el espectro de la muestra problema homogenizada (D) presenta las bandas características tanto de la cocaína (C) como del café molido (B). Al realizar una sustracción al espectro original del espectro de café molido, se pueden apreciar con más claridad en el espectro resultante (A) las bandas características de la cocaína, confirmando que se trata de una mezcla de ambos componentes o, al menos, de un producto vegetal similar o relacionado con el café que se ha mezclado con cocaína. Además, en el espectro de las muestras sospechosas aparece una banda entre 2150-2000 cm^{-1} que no corresponde con el patrón de cocaína ni de su mezcla con el café y que bien podría ser debida a la presencia de un agente enmascarante de la reacción de cocaína con tiocianato de cobalto. Esto nos demuestra el potencial de la técnica ATR-MIR y el tratamiento de los espectros para la caracterización de la matriz en este tipo de muestras complejas.

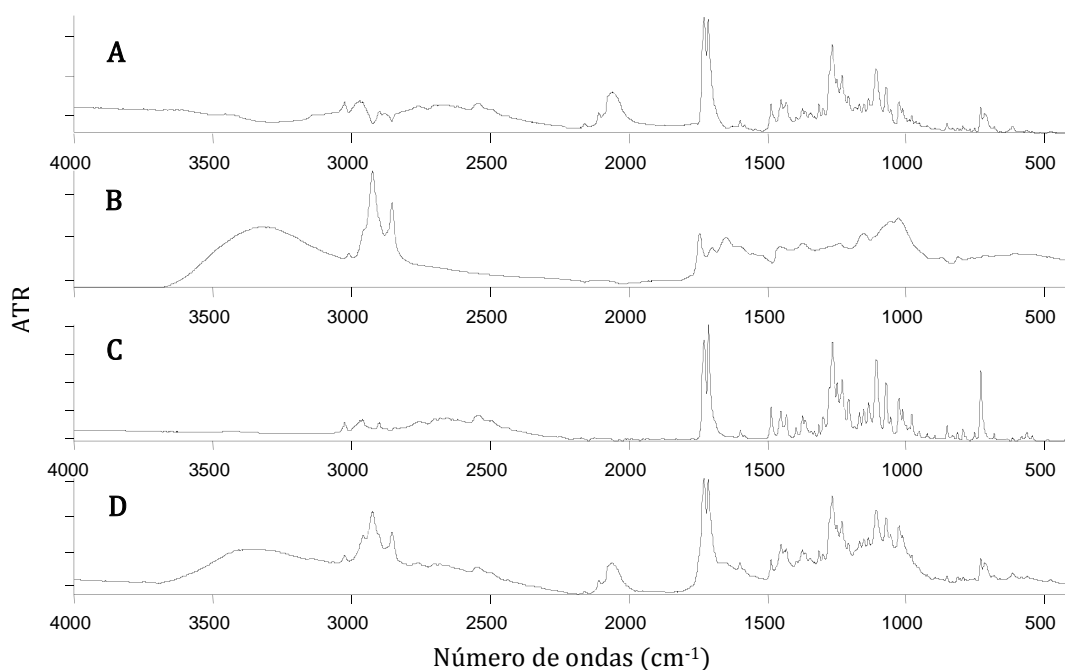


Figura 82. Espectros ATR. A. Espectro resultante de sustraer el espectro de café al de la muestra problema. B. Espectro de café molido. C. Espectro de patrón de cocaína clorhidrato. D. Espectro problema.

Tal como se ha indicado previamente, observando la muestra con detalle se apreciaba la presencia de unos pequeños gránulos más oscuros, lo que indicaba que ésta no era totalmente homogénea. Con objeto de averiguar la diferencia de composición de la muestra se obtienen por separado los espectros de las motas oscuras y del resto de la matriz de la muestra. En la **Figura 83**, se puede apreciar el espectro de la muestra homogénea (A) y el de cada una de las fracciones por separado (B, C). En el espectro de la parte de la muestra con aspecto de motas negras (B) se pueden apreciar con mayor claridad las bandas de la cocaína (D) junto con la sustancia que presenta una banda entre $2150\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$, mientras que la parte de la muestra sin las motas negras (C) es mucho más parecida al espectro de café (E). Esto nos indica que nos encontramos ante una muestra claramente heterogénea y que, por tanto, debe ser adecuadamente homogenizada antes de proceder a su análisis para determinar su contenido en cocaína.

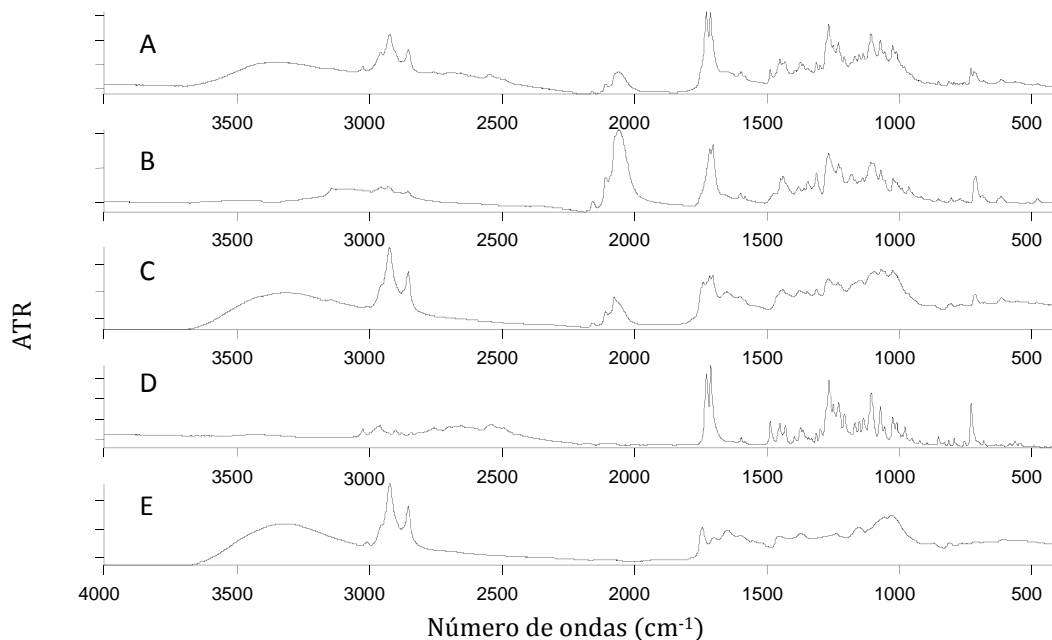


Figura 83. Espectros ATR. Muestra decomisada tras la homogenización (A). Fracción de gránulos negros (B). Fracción una vez eliminados los gránulos negros (C). Patrón de cocaína clorhidrato (D). Café molido de tueste natural (E).

La determinación cualitativa de cocaína en estas muestras sospechosas de café resulta sencilla utilizando el método cualitativo desarrollado en el apartado 4.2.2, para la detección de cocaína y sus adulterantes más comunes en muestras sólidas por medidas ATR-MIR. Los dos primeros resultados de la biblioteca corresponden a cocaína clorhidrato y a cocaína mezclada con levamisol con una calidad de *hit* de 507 y 471 respectivamente, con lo que el segundo resultado se rechazaría por no alcanzar el valor de calidad de *hit* mínimo que hemos establecido en 500. Si aplicamos el método de identidad para los adulterantes esperados el resultado es que no se detecta ninguno de ellos en la muestra y, por tanto, se confirma la presencia de cocaína clorhidrato en estas muestras. Por todo ello, la técnica ATR-MIR constituye una prueba de *screening* rápida y no destructiva para este tipo de muestras, que no necesita de una preparación previa de la muestra para la extracción de la cocaína presente y su posterior análisis por GC-MS.

Para comprobar si pueden detectarse pautas en estas muestras de café que contienen cocaína se realizó un estudio PCA junto con las muestras utilizadas en los conjuntos de calibración y validación del modelo PLS-ATR-MIR para muestras adulteradas. La representación gráfica de los *scores* PC_2 vs PC_1 puede verse en la **Figura 84**.

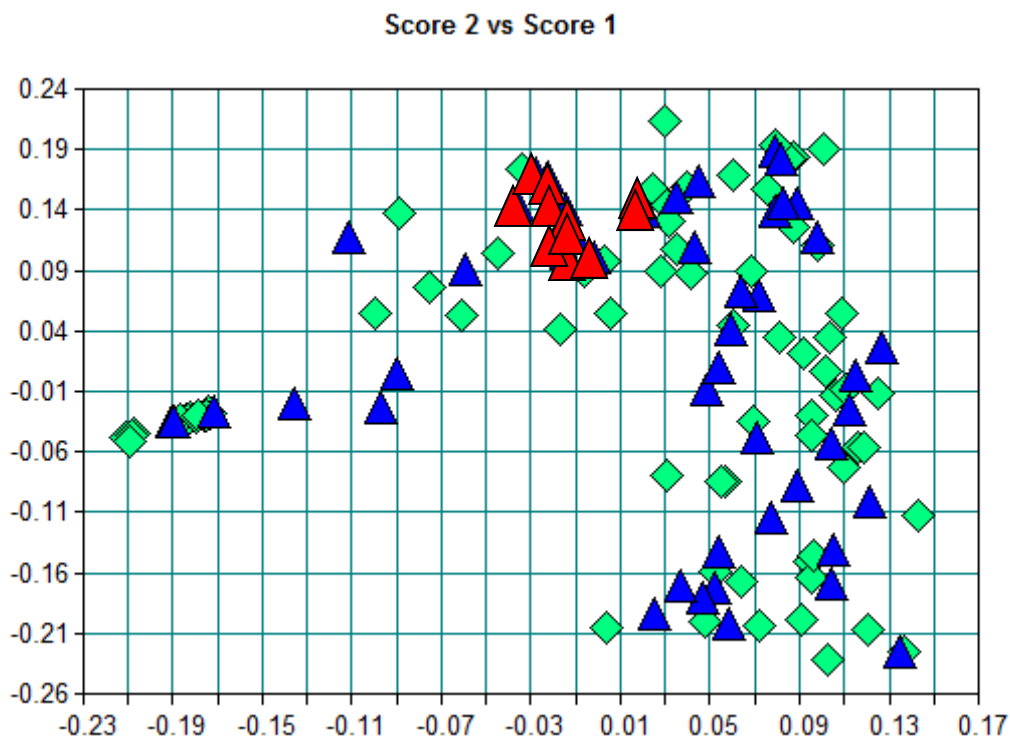


Figura 84. Representación de las medidas ATR-MIR de las muestras de supuesto café sospechosas de contener cocaína en el gráfico de *scores* PC_2 vs PC_1 de las muestras de calibración y validación del modelo PLS-ATR-MIR para muestras adulteradas. Nota: \blacklozenge muestras de calibración, \blacktriangle muestras de validación, \blacktriangle muestras presuntamente de cocaína mezclada con café.

Como se puede observar en el gráfico de *scores*, las muestras objeto de estudio quedan agrupadas junto con las muestras de cocaína adulteradas y, por tanto, se espera que el modelo PLS-ATR-MIR pudiera resultar adecuado para la cuantificación de cocaína en estas muestras sospechosas de café.

Partiendo de estas premisas se planteó el análisis cuantitativo de estas muestras por PLS-ATR-MIR utilizando el modelo PLS-ATR-MIR desarrollado para las muestras adulteradas de cocaína en polvo y se compararon con los obtenidos en el análisis por cromatografía de gases. Los resultados obtenidos se indican en la **Tabla 48**.

Tabla 48. Resultados obtenidos por el modelo PLS-ATR-MIR para las muestras de café conteniendo cocaína.

Decomiso/muestra	Valor de referencia GC-FID % (p/p)	Valor PLS-ATR-MIR % (p/p)	Diferencia % (p/p)
1/1	16.41	20.34	3.94
1/2	20.53	21.48	0.95
1/3	17.83	22.67	4.84
1/4	18.32	22.18	3.86
1/5	18.82	20.24	1.42
1/6	21.86	21.18	-0.68
1/7	18.67	18.20	-0.47
1/8	23.24	17.83	-5.41
1/9	17.18	19.03	1.85
2/1	20.20	22.82	2.62
2/2	17.47	21.94	-4.47
	Media \pm s de las diferencias	0.76 \pm 3.32	
		t_{cal}	0.76
		t_{tab}	2.23

Como se puede observar de la información contenida en la **Tabla 48**, los resultados son estadísticamente comparables a los obtenidos por el método de referencia cuando se aplica un test por parejas. Por tanto, se considera que el modelo PLS-ATR-MIR resulta adecuado para la cuantificación de cocaína en estas muestras.

Con el objetivo de conseguir un modelo con mayor capacidad predictiva para las muestras de café, se planteó construir un nuevo modelo PLS-ATR-MIR específico para estas muestras utilizando únicamente patrones de cocaína y café. Se prepararon mezclas de cocaína y café a diferentes concentraciones, con

el fin de obtener un calibrado para construir un modelo PLS que permitiera cuantificar las muestras decomisadas. En la **Figura 85** se pueden ver los espectros ATR-MIR de una muestra de cocaína mezclada con café comparada con la muestra problema y los espectros de café molido y patrón de cocaína. Las principales diferencias se observan, como ya se había comprobado, en la zona sobre 2000-2150 cm^{-1} . Esto nos demuestra que existe algún tipo de interferencia de la matriz de las muestras, que podría deberse a que se le hubiera añadido algún componente con objeto de enmascarar el ensayo de identificación de la cocaína mediante la prueba con tiocianato de cobalto.

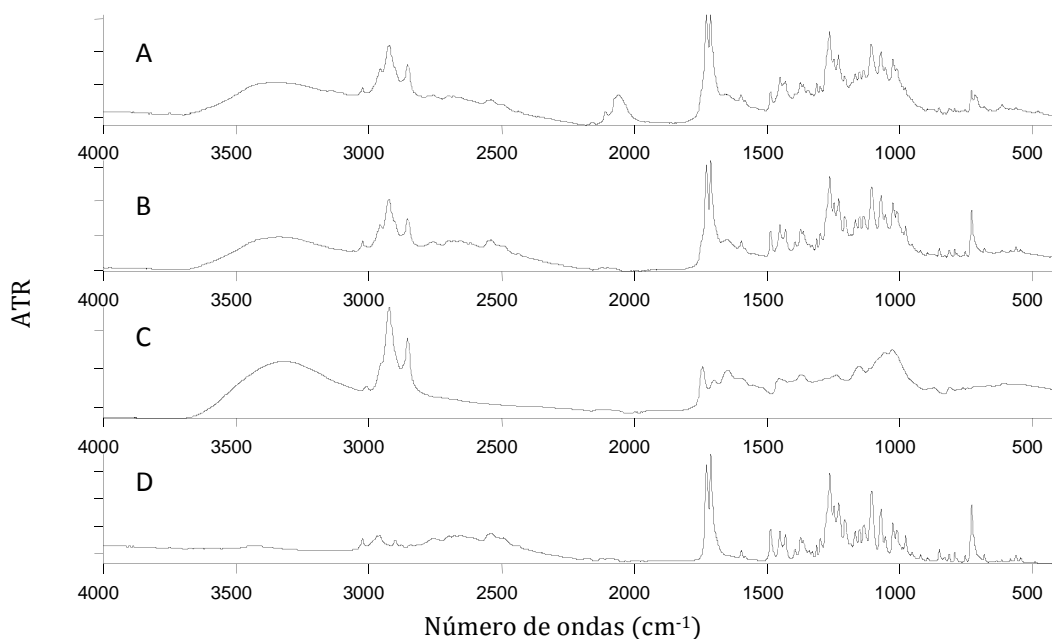


Figura 85. Espectros ATR-MIR. A. Muestra problema de café molido conteniendo un 17.48 % (p/p) de cocaína. B. Mezcla preparada con café común y cocaína clorhidrato con un 25 % (p/p) de cocaína. C. Café común. D. Patrón de cocaína clorhidrato.

Se realizó una validación cruzada con un total de tres muestras medidas por triplicado: una muestra de cocaína clorhidrato y dos mezclas de café molido de tueste natural y cocaína con unas riquezas del 25.0 y el 11.4% (p/p).

Para la selección de las regiones de calibración se comenzó trabajando con la zona del espectro en la que se observaban las bandas del patrón de cocaína y se fue acotando la región y seleccionando el pre-procesado de manera que se obtuviera un modelo con un menor RMSECV. Posteriormente el modelo se validó con el conjunto de muestras decomisadas. Para validar el modelo en diferentes concentraciones, al conjunto de validación además de las muestras decomisadas se añadieron dos mezclas de cocaína y café, a concentraciones de cocaína base 54.6 y 64.7% (p/p). Para comprobar la distribución de las muestras utilizadas en el conjunto de validación y de calibración se realizó un estudio PCA de las mismas, del que se puede ver en la **Figura 86** la representación gráfica de los *scores* PC₂ vs PC₁, donde se observa como las muestras quedan distribuidas en función de la concentración de cocaína presente. Además se aprecia una diferencia entre las muestras procedentes de cada uno de los decomisos. Las muestras pertenecientes a los dos decomisos quedan perfectamente diferenciadas en el gráfico de *scores*, lo cual podría indicar que proceden también de partidas diferentes y no de un mismo granel.

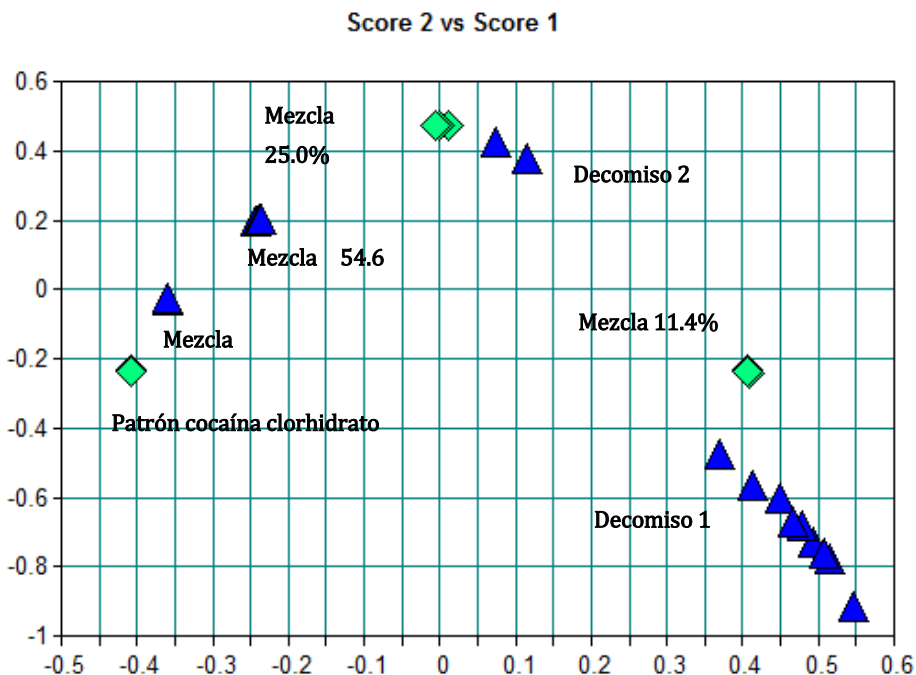


Figura 86. Representación gráfica de los *scores* PC_2 vs PC_1 para los espectros de las muestras utilizadas en el conjunto de calibración (◆) y de validación (▲) del modelo PLS-ATR-MIR para muestras de café conteniendo cocaína.

Como se puede observar en la **Tabla 49** se obtuvo un modelo de 2 factores, con un pre-procesado de los datos consistente en la primera derivada y normalización vectorial, que presenta un RMSECV de 0.55% (p/p), un RMSEP de 2.26 % (p/p) y un RPD de 9.81. Como puede verse, este modelo con sólo dos factores posee errores de validación cruzada y predicción mucho menores que los obtenidos con el modelo de cuatro factores establecido para muestras adulteradas. Este nuevo modelo construido para las muestras mezcladas con café no sólo mejora en cuanto a capacidad predictiva, sino que además mediante el estudio PCA nos permite diferenciar los dos decomisos de los que se dispone, lo que no ocurría con el modelo de muestras adulteradas.

Tabla 49. Parámetros del modelo PLS-ATR-MIR para el análisis de cocaína en muestras de café.

PARÁMETROS DEL MODELO PLS-ATR-MIR	
Modo de medida	ATR-MIR
Regiones del espectro (cm ⁻¹)	3108 a 2637 1305 a 1174 1038 a 963
Pre-procesado	Primera derivada + Normalización Vectorial
Factores	2
R ² (%)	99.99
RMSEE (% p/p)	0.45
RMSECV (% p/p)	0.55
RMSEP (% p/p)	2.26
RPD	9.81

Los valores predichos por el nuevo modelo para cada una de las muestras se pueden ver en la **Tabla 50**.

Tabla 50. Valores predichos por el nuevo modelo PLS-ATR-MIR para las muestras de supuesto café conteniendo cocaína.

Decomiso/muestra	Valor de referencia GC-FID% (p/p)	Valor PLS-ATR-MIR % (p/p)	Diferencia % (p/p)
1/1	16.41	18,73	2,32
1/2	20.53	19,06	-1,47
1/3	17.83	19,03	1,2
1/4	18.32	22,07	3,75
1/5	18.82	20,12	1,3
1/6	21.86	19,01	-2,85
1/7	18.67	19,77	1,1
1/8	23.24	18,87	-4,37
1/9	17.18	21,12	3,94
2/1	20.20	20,02	-0.18
2/2	17.47	17,93	0.46
Media ± s de las diferencias		0.47 ± 2.58	
		<i>t_{cal}</i>	0.58
		<i>t_{tab}</i>	2.23

En conclusión, la técnica ATR-MIR ha demostrado ser adecuada para la identificación de la presencia de cocaína en muestras en las que supuestamente se encontraba mezclada con café y que resultaban negativas a la prueba del tiocianato de cobalto, ya que como se ha podido comprobar, las sustancias añadidas para enmascarar a la cocaína no interfieren en la identificación de las bandas de los espectros ATR-MIR. Además la técnica nos permite, mediante la modelización PLS, determinar de manera cuantitativa el contenido de cocaína presente en este tipo de muestras.

4.6.2 Muestras de cocaína negra compactada

En este caso de estudio nos encontramos con un decomiso de polvo negro compactado, que no se disgregaba fácilmente en el mortero, como suele ocurrir con las pastillas de polvo compactado de cocaína de un kilo, que presentaba un aspecto totalmente diferente a éstas y que desprendía un intenso olor. La reacción a tiocianato de cobalto resultó negativa pero por las características de la aprehensión se sospechaba que podía contener cocaína.

Se planteó la determinación de cocaína por el método cualitativo ATR-MIR desarrollado para las muestras en polvo y, para ello, se registró el espectro de la muestra, que se puede ver en la **Figura 87**. En este caso, resulta complicado realizar una identificación de las bandas de cocaína, probablemente debido a que está mezclada con algún tipo de sustancia utilizada para la compactación y es de destacar que aparece una intensa banda sobre $2000\text{-}2150\text{ cm}^{-1}$. Los dos primeros resultados obtenidos al aplicar el test cualitativo ATR-MIR son mezcla de cocaína con levamisol, cafeína y fenacetina y mezcla de cocaína con levamisol, fenacetina y procaína con una calidad de *hit* de 176 y 149 respectivamente. En este caso la aplicación del test no es adecuada ya que en la comparación con la biblioteca no se alcanza la mínima calidad de *hit* que hemos establecido para su aplicación, muy probablemente a causa de la fuerte contribución al espectro IR por parte de la matriz de la muestra.

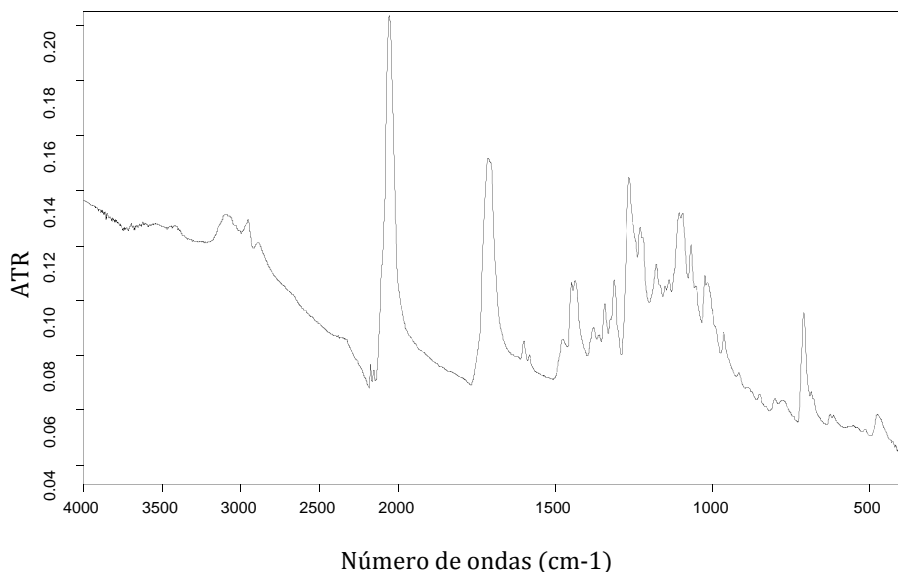


Figura 87. Espectro ATR-MIR de una muestra de polvo compactado negro conteniendo cocaína.

Con el objetivo de detectar posibles pautas de esta muestra se realizó un estudio PCA con las muestras utilizadas en el conjunto de calibración y de validación del modelo PLS-ATR-MIR para muestras adulteradas en polvo. En el gráfico de *scores* PC₂ vs PC₁ de la **Figura 88** se puede apreciar que las réplicas correspondientes a la muestra problema quedan agrupadas junto con las muestras de cocaína adulteradas, probablemente debido a la presencia de cocaína en la muestra compactada. Se planteó entonces utilizar un algoritmo de comparación diferente para éstas muestras, teniendo en cuenta el pre-tratamiento del espectro y las regiones espectrales seleccionadas en el modelo PLS-ATR-MIR. En lugar del algoritmo estándar se empleó la correlación espectral con un pre-tratamiento de normalización vectorial excluyendo la región de 4000 a 1767 cm⁻¹. Los dos primeros resultados obtenidos son patrón de cocaína clorhidrato y cocaína adulterada con levamisol con una calidad de *hit* de 617 y 598 respectivamente, lo que permite la aplicación de los test de conformidad para los adulterantes que dan un resultado negativo, con lo que el

test cualitativo daría como resultado la presencia de cocaína, sin que se detecte ninguno de los seis adulterantes con los que se ha trabajado en los estudios realizados en esta Tesis Doctoral.

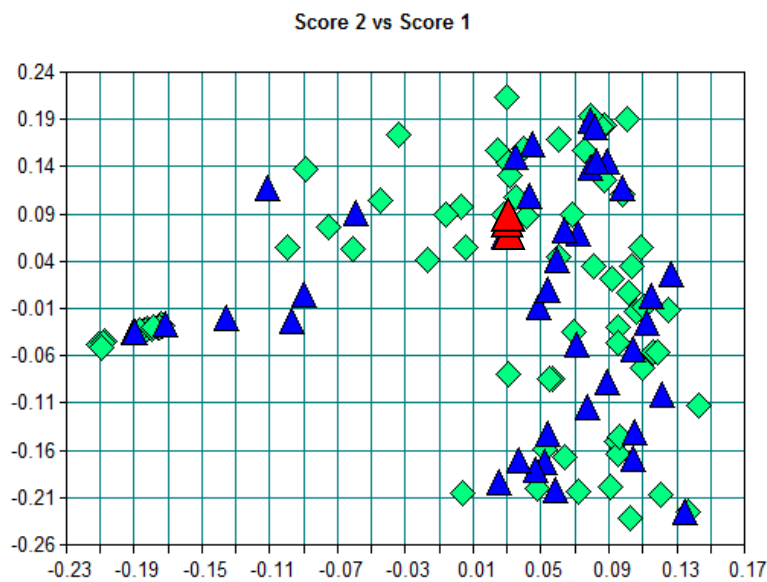


Figura 88. Representación de las medidas ATR-MIR de las muestras de cocaína negra compactada en el gráfico de *scores* PC_2 vs PC_1 de las muestras de calibración y validación del modelo PLS-ATR-MIR para muestras adulteradas. Nota: \blacklozenge muestras de calibración, \blacktriangle muestras de validación, \blacktriangle muestras de cocaína negra compactada.

Considerando que la muestra sospechosa de contener cocaína ha quedado agrupada con las muestras de cocaína en polvo adulterada empleadas en la modelización PLS-ATR-MIR, se decidió analizarla mediante este modelo y, en la **Tabla 51**, se comparan los resultados obtenidos para las réplicas con los valores de referencia correspondientes al análisis cromatográfico de las mismas.

Tabla 51. Resultados obtenidos para las muestras de cocaína compactada negra aplicando el modelo PLS-ATR-MIR para muestras de cocaína en polvo.

Muestra (alícuota)	Valor de referencia GC-FID % (p/p)	Valor PLS-ATR-MIR % (p/p)
1	19.87	19.41
2	18.96	19.63
3	19.67	19.58
Media \pm s	19.50 \pm 0.48	19.54 \pm 0.11
	t_{cal}	0.14
	t_{tab}	3.18

Como se puede observar, el modelo PLS-ATR-MIR resulta más preciso que el procedimiento GC-FID, que requiere la extracción previa de la cocaína de la muestra. Si aplicamos el test estadístico para la comparación de las medias, el resultado es que los valores obtenidos para la muestra problema por el procedimiento PLS-ATR-MIR son estadísticamente comparables a los obtenidos por el método de referencia GC-FID. A pesar que la predicción de esta muestra ha ofrecido resultados aceptables, como tan solo se dispone de una muestra no sería adecuado generalizar las conclusiones, por lo que resultaría necesario realizar un estudio más amplio con un mayor número de muestras, de estas características o similares, para poder afirmar que el modelo PLS-ATR-MIR construido con las muestras adulteradas es adecuado para la predicción en el análisis de rutina de este tipo de muestra o si sería necesario construir un nuevo modelo que resultara más específico.

5

Conclusiones finales

La espectroscopia infrarroja, tanto mediante medidas de reflexión difusa en el infrarrojo próximo como a través de medidas de reflexión total atenuada en el infrarrojo medio, ha demostrado ser una técnica de gran utilidad para la detección y determinación de cocaína en sus diferentes formas de presentación: en polvo, disuelta, en soportes impregnados y mezclada con sustancias para interferir su detección.

Las principales ventajas que se obtienen con el uso de estas técnicas vibracionales son:

1. Tanto la espectroscopia DR-NIR como ATR-MIR permiten realizar determinaciones cuantitativas comparables en cuanto a exactitud y precisión a las de los métodos de referencia GF-FID empleados en la actualidad en los Laboratorios Oficiales de Control de Drogas con una mínima manipulación de la muestra y sin requerir el uso de disolventes ni reactivos, lo cual redundará en beneficios para el operador y el medio ambiente.
2. Ambas son técnicas no destructivas, lo que permite conservar la muestra para futuros análisis en caso de que sea requerido.
3. Son técnicas relativamente económicas, que están al alcance de la mayoría de laboratorios de análisis, debido al tipo de instrumentación

que se requiere; la paulatina introducción de las mismas en los laboratorios de análisis se debe, además de los consiguientes desarrollos metodológicos, a la reducción del coste de adquisición y mantenimiento de los equipos. Además, la introducción de sistemas portátiles permitiría llevar a cabo las determinaciones *in situ* y de forma rápida.

4. Se ha puesto a punto un procedimiento analítico que permite caracterizar las muestras, en relación a la presencia de cocaína y sustancias adulterantes que la puedan acompañar, a partir del espectro ATR-MIR de las mismas sin necesidad de un tratamiento previo, evidenciando que la espectroscopia ATR-MIR permite realizar determinaciones cualitativas de cocaína con ayuda de los algoritmos de comparación de espectros. Se pueden construir bibliotecas y test de conformidad de forma sencilla y, de esta forma, aumentar la capacidad de la técnica como herramienta para el análisis cualitativo, que debería considerarse como buena alternativa de técnica de elección en el caso de muestras a las cuales se les ha añadido alguna sustancia para enmascarar los test presuntivos de color.
5. La unión de estas técnicas con métodos de reconocimiento de pautas como el HCA o el PCA permite una evaluación rápida de las muestras, dando como resultado una clasificación que permite establecer el tipo de patrones a partir de los cuales se podrían construir modelos para la determinación cuantitativa de cocaína en diferentes tipos de muestras sólidas provenientes del tráfico ilícito o que, como en el caso de las disoluciones de cocaína y los tejidos impregnados, puedan analizarse sin un tratamiento previo.

6

Bibliografía

- [1] Pérez-Alfonso, C.; Galipienso, N.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. A green method for the determination of cocaine in illicit samples. *Forensic Sci. Int.*, 237 (2014) 70-77.
- [2] Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. UNODC. Métodos recomendados para la identificación y el análisis de cocaína en materiales incautados. ST/ NAR/7/Rev.1 (2012). Disponible en (5-1-2017): https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine_S.pdf
- [3] Grzybowski, A. The history of cocaine and its importance to the discovery of the different forms of anesthesia. *Klin Oczna*, 109 (2007) 101-105.
- [4] Freud, S. Beitrag zur Kenntnis der Cocawirkung. *Wienwe Medizinische Wochenschrift*, XXV (1885) 129-133.
- [5] Freud, S. Uber coca. *Zentralblatt fur GesamteTherapie*, 2 (1884) 289.
- [6] Herrera, A. Epistemología del psicoanálisis. Palibrio. EE UU. 2013.
- [7] Imagen de anuncio obtenida de: <https://infomag.es/2016/12/08/anuncios-vintage-de-cuando-la-heroina-y-la-cocaina-eran-legales/>
- [8] Imagen de anuncio obtenida de: <http://www.postersplease.com/component/k2/item/81361->

- [9] Ley 17/1967, de 8 de abril, por la que se actualizan las normas vigentes sobre estupefacientes y adaptándolas a lo establecido en el convenio de 1961 de las Naciones Unidas. BOE núm. 86, de 11 de abril de 1967, páginas 4806 a 4809.
- [10] Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (UNODC). World Drug Report 2015. Disponible en (3-01-2017):
https://www.unodc.org/documents/wdr2015/WDR15_ExSum_S.pdf
- [11] Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (2016). Informe Europeo sobre Drogas 2016: Tendencias y novedades. Oficina de Publicaciones de la Unión Europea. Luxemburgo.
Disponible en (29-12-2016):
<http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2637/TDAT16001ESN.pdf>
- [12] Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA). Informe Europeo sobre Drogas 2015. Tendencias y Novedades. Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, Luxemburgo.
Disponible en (29-12-2016):
http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_239505_ES_TDAT15001ESN.pdf
- [13] La cocaína. Una perspectiva de la Unión Europea en el contexto mundial. Publicaciones conjuntas OEDT-EUROPOL. Luxemburgo. 2010.
Disponible en (3-01-2017):
http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/554/TDAN09002ESC_204899.pdf
- [14] Centro de Inteligencia contra el Terrorismo y el Crimen Organizado (CITCO). Compendio sobre drogas y precursores. 2012.
- [15] Hantson, P. Cocaine adulterated with levamisole: Which are the risks?. *Toxicol. Anal. Clin.*, 27 (2015) 216-225.
- [16] Código penal español y legislación complementaria. Boletín Oficial del Estado. 2016. Disponible en (5-1-2017):

https://boe.es/legislacion/codigos/codigo.php?id=038_Codigo_Penal_y_legislacion_complementaria&modo=1

- [17] Acuerdo del Pleno de la Sala 2ª del Tribunal Supremo de 19 de noviembre del 2001. Acuerdos del Pleno Sala 2º Tribunal Supremo. Años 2000-2012. 2013.
- [18] Centro de Inteligencia contra el Terrorismo y el Crimen Organizado (CITCO). Punibilidad del tráfico ilícito de drogas a pequeña escala. Madrid. 2007.
- [19] Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA). Informe 2015. Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. Madrid. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. Disponible en (5-1-2017):
http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/informeEstadisticas/pdf/INFORME_2015.pdf
- [20] Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (UNODC). World Drug Report 2014. Disponible en (5-1-2017):
http://www.unodc.org/documents/wdr2014/V1403603_spanish.pdf
- [21] Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) Recommendations. (2016). Disponible en (5-1-2017):
<http://www.swgdrug.org/Documents/SWGDRUG%20Recommendations%20Version%207-1.pdf>
- [22] Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) Supplemental Document SD-2 FOR PART IVB QUALITY ASSURANCE/VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS. 2006.
Disponible en (5-1-2017):
<http://www.swgdrug.org/Documents/Supplemental%20Document%20SD-2.pdf>
- [23] Centro de Inteligencia contra el Terrorismo y el Crimen Organizado (CITCO). Laboratorios de cocaína. 2012.
- [24] Lapachinske, S.F.; Okai, G.G.; dos Santos, A.; de Bairros, A.V.; Yonaminem, M. Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian Federal Police. *Forensic Sci. Int.*, 247 (2015) 48-53.

- [25] de Souza, L.M.; Rodrigues, R.R.; Santos, H.; Costa, H.B.; Merlo, B.B.; Filgueiras, P.R.; Poppi R.J.; Vaz, B.G.; Romao, W. A survey of adulterants used to cut cocaine in samples seized in the Espírito Santo State by GC–MS allied to chemometric tools. *Sci. Justice*, 56 (2016) 73–79.
- [26] Broséus, J.; Huhtala, S. ; Esseiva, P. First systematic chemical profiling of cocaine police seizures in Finland. *Forensic Sci. Int.*, 251 (2015) 87–94.
- [27] Andreasen, M.; Lindholm, C.; Kaa, E. Adulterants and diluents in heroin, amphetamine, and cocaine found on the illicit drug market in Aarhus, Denmark. *Open Forensic Sci. J.*, 2 (2009) 16–20.
- [28] Brunt, T.; Rigter, S.; Hoek, J.; Vogels, N.; Dijk, P.V.; Niesink, R. An analysis of cocaine powder in the Netherlands: content and health hazards due to adulterants. *Addiction*, 104 (2009) 798–805.
- [29] Evrard, I.; Legleye, S.; Cadet-Taïrou, A. Composition: purity and perceived quality of street cocaine in France. *Int. J. Drug Policy*, 21 (2010) 399–406.
- [30] Schneider, S.; Meys, F. Analysis of illicit cocaine and heroin samples seized in Luxembourg from 2005–2010. *Forensic Sci. Int.*, 212 (2011) 242–246.
- [31] Dujourdy, L.; Besacier, F.; Ladroue, V. Cocaine seized in France. Statistical data from National database of the national forensic institute. *Actual. Chimique*, 342 (2010) 29–36.
- [32] Fucci, N. Phenacetin and cocaine in a body packer. *Forensic Sci.Int.*, 141 (2004) 59-61.
- [33] Tallarida, C.S.; Egan, E.; Alejo, G.D.; Raffa, R.; Tallarida, R.J.; Rawls, S. M. Levamisole and cocaine synergism: A prevalent adulterant enhances cocaine's action in vivo. *Neuropharmacology*, 79 (2014) 590-595.
- [34] Miner, J.; Gruber, P.; Perry, T.L. Early excision and grafting, an alternative approach to the surgical management of large body surface area levamisole-adulterated cocaine induced skin necrosis. *Burns*, 41(2015) e34-e40.

- [35] Tallarida, C.S.; Tallarida, R.J.; Rawls, S.M. Agranulocytosis and vasculitis in a cocaine addict: Levamisole, the hidden culprit. *Rev. Med Interne*, 35 (2014) 676-679.
- [36] Ventura, M.; Caudevilla, F.; Vidal, C. Cocaína adulterada con levamisol. Posibles implicaciones clínicas. *Med. Clin.*, 8 (2011) 367-368.
- [37] Jamey, C.; Kintz, P.; Raul, J.S. Levamisole and cocaine: An association to follow-up. *Toxicol. Anal. Clin.*, 1 (2016) 64-70
- [38] Prieto, J.P.; Galvalisi, M.; López-Hill, X.; Meikle, M. N.; Abin-Carriquiry, J.A.; Scorza, C. Caffeine enhances and accelerates the expression of sensitization induced by coca paste indicating its relevance as a main adulterant. *Am. J. Addict.*, 24 (2015) 475-481.
- [39] O'Neill, C.E. ; Levis, S.C. ; Schreiner, D.C. ; Amat, J.; Maier, S. F.; Bachtell, R.K. Effects of adolescent caffeine consumption on cocaine sensitivity. *Neuropsychopharmacology*, 40 (2015) 813-821.
- [40] Gad, S. Phenacetin. Refence Module in Biomedical Sciencies, from Encyclopedia of Toxicology (Third Edition). Academic Press . EEUU. 2014
- [41] List of Classifications. IARC Monographs 1-117. 2016.
Disponible en (5-1-2017):
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>
- [42] Mete, M.; Aydemir, I.; Tuglu, I.M.; Selcuki, M. Neurotoxic effects of local anesthetics on the mouse neuroblastoma NB2a cell line. *Biotech. Histochem.*, 90(2015) 216-222.
- [43] Grobério, T.S. ; Zacca, J.J.; Botelho, E.D.; Talhavini, M.; Braga, J. W. Discrimination and quantification of cocaine and adulterants in seized drug samples by infrared spectroscopy and PLSR. *Forensic Sci. Int.*, 257 (2015) 297-306.
- [44] S. Grabherr, S.R. Detection of smuggled cocaine in cargo using MDCT. *Am. J. Roentgenol*, 190 (2008) 1390-1395.

- [45] Drug Enforcement Administration (DEA). Water soluble matrix (containing cocaine) seized in or nearby Villavicencio, Colombia, South America. *Microgram Bulletin*, 35 (2008) 137.
- [46] Eliasson, C.; Macleod, N.A.; Matousek, P. Non-invasive detection of cocaine dissolved in beverages using displaced Raman Spectroscopy. *Anal.Chim.Acta*, 607 (2008) 50-53.
- [47] Mc Nicholas, M. *Maritime Security: An introduction*. Butterworth-Heinemann. Burlington. USA. 2016.
- [48] DEA history 1980- 1985. Disponible en (5-1-2017): <https://www.dea.gov/about/history/1980-1985.pdf>
- [49] S.D. McDermott, J.D. Drug smuggling using clothing impregnated with cocaine. *J. Forensic Sci.*, 50 (2005) 1423-1425.
- [50] Drug Enforcement Administration (DEA). Cocaine impregnated silicone in baseball cap parts in Peru. *Microgram Journal*, 36 (2003) 271.
- [51] Levante-EMV. Llevaba 6 kilos de cocaína impregnada en ropa. Hemeroteca. Sección de sucesos. Editorial Prensa Valenciana, S.A. 30 de mayo de 2014. Disponible en (29-12-2016): <http://www.levante-emv.com/sucesos/2014/05/30/llevaba-6-kilos-cocaina-impregnada/1118771.html>
- [52] La Voz de Galicia. Desarticulada una organización de narcos que introducía cocaína impregnada en papel en envíos postales. Hemeroteca. Redacción. (3 de Marzo de 2015). Disponible en (5-1-2017): <http://www.lavozdegalicia.es/ourense/2015/03/03/00031425384211628544255.htm>
- [53] Mc Nicholas, M. *Maritime Security: An introduction*. Butterworth-Heinemann. Burlington. USA. 2011.
- [54] Binette, M.J. ; Pilon, P. Detecting black cocaine using various presumptive drug test. *Microgram Journal*, 10 (2013) 8-11.

- [55] Khan, J.I.; Kennedy, T.J.; Christian, D.R. *Basic Principles of Forensic Chemistry*. Humana Press. New York. 2012.
- [56] Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). *Orientaciones para la implantación de un sistema de gestión de la calidad en los laboratorios de análisis de drogas*. ST/NAR/37. 2009.
Disponible en (5-1-2017):
https://www.unodc.org/documents/scientific/QMS_Spanish_web.pdf
- [57] *Requisitos generales relativos a la competencia técnica de los laboratorios de ensayo y calibración*. UNE-EN-ISO IEC 17025:2005.
- [58] Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. 2010. Disponible en (5-1-2017):
https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf
- [59] *Imagen de un coca-test en aerosol*. Obtenida de (5-1-2017):
<http://www.mistralsecurityinc.com/Our-Products/Drug-Detection-and-Identification-Field-Test-Kits/Aerosols>
- [60] *Imagen de un cromatógrafo marca Agilent*. Obtenida de (5-1-2017):
<http://www.agilent.com/>
- [61] *Representación esquemática del funcionamiento de un cromatógrafo*. Obtenido de (5-1-2017):
<https://lidiaconlaquimica.wordpress.com/2015/08/05/instrumentacion-en-la-cromatografia-gas-liquido/>
- [62] *Representación de un cromatograma para dos compuestos*. Obtenido de (5-1-2017):
<http://www.uib.cat/depart/dqu/dquo/dquo2/pau/Cromatograf%92a/cromatograma.html>

- [63] Representación esquemática del funcionamiento de un cromatografo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Obtenido de (5-1-2017): http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401539/execute%20de%20agosto/leccin_31_instrumentacin_en_espectrometra_de_masas.html
- [64] Macho Aparicio, S. (2002). Metodologías analíticas basadas en espectroscopia de infrarrojo y calibración multivariante. Aplicación a la industria petroquímica (Tesis Doctoral). Universitat Rovira i Virgili. Tarragona.
- [65] Hargreaves, M.D.; Edwards, H.G.; Chalmers, J.M. Infrared and Raman spectroscopy in Forensic Science. John Wiley & Sons. New York. 2012.
- [66] Moros, J.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. Vibrational spectroscopy provides a green tool for multi-component analysis. *TrAc-Trends Anal. Chem.*, 29 (2010) 579-591.
- [67] Stuart, B. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Wiley. New York. 2004.
- [68] Imagen esquemática del fenómeno de reflexión total interna. Obtenido de (5-1-2017): <http://www.seas.es/blog/automatizacion/reflexion-y-refraccion-de-la-luz-en-transmisiones-de-fibra-optica/>
- [69] Esquema de un accesorio ATR. Perkin-Elmer. Technical Note. FT-IR spectroscopy. Attenuated Total Reflectance (ATR). 2005. Disponible en (5-1-2017): http://www.uts.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf
- [70] Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. Green Analytical Chemistry. *TrAc-Trends Anal. Chem.*, 27 (2008) 497-511.
- [71] Representación esquemática del fenómeno de reflexión especular y reflexión difusa. Obtenido de (5-1-2017): https://es.wikibooks.org/wiki/F%C3%ADsica/%C3%93ptica/Reflexi%C3%B3n_y_refracci%C3%B3n

- [72] Tasumi, M. Introduction to Experimental Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Practical Methods. Wiley. New York. 2014.
- [73] Mongay Fernández, C. Quimiometría. Universitat de València. Valencia. 2005.
- [74] Monfreda, M.; Varani, F.; Cattaruzza, F.; Ciambone, S.; Proposito, A. Fast profiling of cocaine seizures by FTIR spectroscopy and GC-MS analysis of minor alkaloids and residual solvents. *Sci. Justice*, 55 (2015) 456-466.
- [75] Marcelo, M.C.; Mariotti, K.C.; Ferrão, M.F.; Ortiz, R.S. Profiling cocaine by ATR-FTIR. *Forensic Sci. Int.*, 246 (2015) 65-71.
- [76] Custers, D.; Cauwenbergh, T.; Bothy, J. L. ; Courselle, P.; De Beer, J. O.; Apers, S.; Deconinck, E. ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics: An interesting tool to discriminate and characterize counterfeit medicines. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 112 (2015) 181-189.
- [77] Daéid, N.N.; Waddell, R.J. The analytical and chemometric procedures used to profile illicit drug seizures. *Talanta*, 67 (2005) 280-285.
- [78] Peña, D. Analisis de datos multivariantes. Mc Graw Hill Education. Madrid. 2002.
- [79] Ma, B.; Wang, L. An Application of Rapid Detection Technologies in a National Regulatory Laboratory Setting: Differentiating Imported and Domestic Drug Products of Oxcarbazepine Using Handheld Raman, Near Infrared, and Portable FTIR Analyzers. American Pharmaceutical Review. April 2, 2015. Disponible en (29-12-2016): <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/173075-An-Application-of-Rapid-Detection-Technologies-in-a-National-Regulatory-Laboratory-Setting-Differentiating-Imported-and-Domestic-Drug-Products-of-Oxcarbazepine-Using-Handheld-Raman-Near-Infrared-and-Portable-FTIR-Analyzers/>
- [80] Miller, J.N.; Miller, J.C. Estadística y quimiometría para Química Analítica. Pearson. Madrid. 2002.

- [81] Ward, J.H., Jr. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Amer. Statist. Assoc.*, 58 (1963) 236-244.
- [82] Ferreira, L.; Hitchcock, D.A. Comparison of Hierarchical Methods for Clustering Functional Data. *Commun. Stat. Simulat.*, 38 (2009) 1925-1949.
- [83] Gallardo, M.A. Métodos Jerárquicos de Análisis *cluster*. Disponible en (5-1-2017):<http://www.ugr.es/~gallardo/pdf/cluster-3.pdf>
- [84] Moros, J.; Galipienso, N.; Vilches, R.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. Nondestructive direct determination of heroine in seized illicit street drugs by diffuse reflectance near-infrared spectroscopy. *Anal. Chem.*, 80 (2008) 7257-7265.
- [85] Rodrigues, N.; Cardoso, E.; Andrade, M.; Sena, C. D. Analysis of seized cocaine samples by using chemometric methods and FTIR spectroscopy. *J. Braz. Chem. Soc.*, 24 (2013) 507-517.
- [86] Salkind, N.; Abdi, H. Partial Least Square Regression. PLS-Regression. Encyclopedia of Measurement and Statistics. Neil Salkind. Kansas. 2007.
- [87] Valencia Delfa, J.L. Regresión PLS en las ciencias experimentales. Ed. Complutense. Madrid. 2009.
- [88] Adams, M.J. Chemometrics in Analytical Spectroscopy. Royal Society of Chemistry. Series editor Neil W. Barnett. Cambridge. 2004.
- [89] Blanco, M.; Cerdá, V. Temas avanzados de Quimiometría. Universitat de les Illes Balears. 2007.
- [90] Food and Drug Administration (FDA). Development and Submission of Near Infrared Analytical Procedures, Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services. 2015.
- [91] Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab.*, 58 (2001)109-130.

- [92] Ravreby, M. Quantitative determination of cocaine and heroine by Fourier-transform infrared spectrophotometry. *J. Forensic Sci.*, 32 (1987) 20-37.
- [93] Wielbo, D.; Tebbett, I.R. The use of micro-Fourier transform infrared-spectroscopy for the rapid identification of street drugs-determination of interference by common diluents. *J. Forensic Sci. Soc.*, 33 (1993). 25-32.
- [94] Ng, P.H; Walker S.; Tahtouh, M.; Reedy, B. Detection of illicit substances in fingerprints by infrared spectral imaging. *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (2009) 2039-2048.
- [95] Chang, Y.G.; Wägli, P.; Paeder, V.; Homsy, A.; Hvozدارa, L.; van der Wal, P.; Di francesco, J.; de Rooij, N. F.; Peter Herzig, H. Cocaine detection by a mid-infrared waveguide integrated with a microfluidic chip. *Lab. Chip*, 12 (2012) 3020-3023.
- [96] Bukowski, E.J.; Monti, J.A. FTIR-ATR spectroscopy for identification of illicit drugs seized from clandestine laboratories. *Am. Lab.*, 39 (2007) 16.
- [97] Sondermann, N.; Kovar, K.A. Identification of ecstasy in complex matrices using near-infrared spectroscopy. *Forensic Sci. Int.*, 102 (1999) 133-147.
- [98] Sondermann, N.; Kovar, K.A. Screening experiments of ecstasy street samples using near infrared spectroscopy. *Forensic Sci Int.*, 106 (1999) 147-156.
- [99] Larsen, R. A.; Jin, C.; Akao, K. Rapid identification of illicit and prescription drugs using FT-NIR spectroscopy. *Spectroscopy*, (2008) Suppl. 8-11.
- [100] Wu, G.P.; Xiang, B.R. A new method for fast and non destructive analysis of heroine, 6-acetylmorphine and codeine in drug by near infrared spectroscopy. *Chin. J. Anal. Chem.*, 35 (2007) 552-554.
- [101] Tsujikawa, K; Yamamuro, T; Kuwayama, K; Kanamori, T; Iwata, Y.T; Miyamoto, K; Kasuya, F.; Inoue, H. Application of a portable near infrared spectrometer for presumptive identification of psychoactive drugs. *Forensic Sci. Int.*, 242 (2014) 162-171.

- [102] Anzanello, M.; Kahmann, A.; Marcelo, M.; Mariotti, K.; Ferrao, M.; Ortiz., R. Multicriteria wavenumber selection in cocaine classification. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 115 (2015) 562-569.
- [103] Schneider, R.C.; Kovar, K.A. Analysis of ecstasy tablets: comparison of reflectance and transmittance near infrared spectroscopy. *Forensic Sci. Int.*, 134 (2003) 187-195.
- [104] Risoluti, R.; Materazzi, S.; Gregori, A.; Ripani, L. Early detection of emerging street drugs by near infrared spectroscopy and chemometrics. *Talanta*, 153 (2016) 407-413.
- [105] Ali, E.M.A.; Edwards, H.G.M.; Hargreaves, M.D.; Scowen, I.J. In situ detection of cocaine hydrochloride in clothing impregnated with the drug using benchtop and portable Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.*, 41 (2010) 938-943.
- [106] Ali, E.M.A.; Edwards, H.G.M. Screening of textiles for contraband drugs using portable Raman spectroscopy and chemometrics. *J. Raman Spectrosc.*, 45 (2014) 253-258.
- [107] Ali, E.M.A.; Edwards, H.G.M, Scowen, I.J. Rapid in situ detection of street samples of drugs of abuse on textile substrates using microRaman spectroscopy. *Spectrochim. Acta A*, 80 (2011) 2-7.
- [108] Ali, E.M.A.; Edwards, H.G.M.; Hargreaves, M.D.; Scowen, I.J. In-situ detection of drugs-of-abuse on clothing using confocal Raman microscopy. *Anal. Chim. Acta*, 615 (2008) 63-72.
- [109] Bruker. Manual de usuario OPUS. BukerOptik. 2006.
- [110] Zacca, J.J; Grobério, T.S.; Maldaner, A.O.; Vieira, M. L.; Braga; J.W.B. Correlation of Cocaine Hydrochloride Samples Seized in Brazil Based on Determination of Residual Solvents: An Innovative Chemometric Method for Determination of Linkage Thresholds. *Anal. Chem.*, 85 (2013)2457-2464.

- [111] Ehleringer, J.R.; Casale, J.F.; Lott, M.J.; Ford, V.L. Tracing the geographical origin of cocaine: cocaine carries a chemical fingerprint from the region where the coca was grown. *Nature*, 408 (2000) 311-312.
- [112] Mallete, J.R.; Casale, J.F.; Jordan, J.; Morello, D.R.; Beyer, P.M. Geographically Sourcing Cocaine's Origin – Delineation of the Nineteen Major Coca Growing Regions in South America. *Scientific Reports*6, Article number: 23520 (2016). Disponible en (5-1-2017): <http://www.nature.com/articles/srep23520>
- [113] Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A.; Moreda-Piñeiro, J.; Bermejo-Barrera, A.; Bermejo-Barrera, A.A Study of Illicit Cocaine Seizure Classification by Pattern Recognition Techniques Applied to Metal Data. *J. Forensic Sci.*, 44 (1999) 270-275.
- [114] Dixon, S. J.; Brereton, R. G.; Carter, J. F.; Sleeman, R. Determination of cocaine contamination on banknotes using tandem mass spectrometry and pattern recognition. *Anal. Chim. Acta*, 559 (2006) 54-63.
- [115] Casale, J. F.; Watterson J. W.A computerized neural network method for pattern recognition of cocaine signatures. *J. Forensic Sci.*, 38 (1993) 292-301.
- [116] Daéid, N. Nic.; Waddell, R.J.H. The analytical and chemometric procedures used to profile illicit drug seizures. *Talanta*, 67 (2005) 220-228.
- [117] Moros, J.; Iñón, F.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. Near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and neural networks for measuring nutritional parameters in chocolate samples. *Anal. Chim. Acta*, 584 (2007) 215-222.
- [118] Chang, C.; Laird, D.; Mausbach, M.; Hurburgh, C. J. Near infrared reflectance spectroscopy-principal components regression analyses os soil properties. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 65 (2001) 480-490.
- [119] Cozzolino, D.; Cynkar, W.; Shah, N.; Smith, P. Multivariate data analysis applied to spectroscopy: Potential application to juice and fruit quality. *Food Res. Int.*, 44, (2011) 888-1896.

- [120] Bellon-Maurel, V.; Fernandez-Ahumada, E.; Palagos, B.; Roger, J. M.; McBratney, A. Critical review of chemometric indicators commonly used for assessing the quality of the prediction of soil attributes by NIR spectroscopy. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 29 (2010) 1073–1081.
- [121] Burns, D.; Ciurczak, E. *Handbook of Near Infrared Analysis*. Taylor&Francis Group. Boca Ratón. 2008.