

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria



TESIS DOCTORAL

**Estudio de marcadores biológicos de drogas de abuso :
utilidad médico-laboral**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Mario Antonio Vargas Aguilar

DIRECTOR:

Fernando Bandrés Moya

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5321353117

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGIA Y LEGISLACIÓN SANITARIA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE MARCADORES BIOLÓGICOS
DE DROGAS DE ABUSO.
UTILIDAD MÉDICO-LABORAL**

Mario Antonio Vargas Aguilar

Director: Dr. Fernando Bandrés Moya

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento personal al Dr. Fernando Bandrés Moya, Director de esta tesis por su extraordinaria sensibilidad humana, comprensión y apoyo recibidos durante el asesoramiento para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. José María Ruiz de la Cuesta por su inestimable ayuda, amistad y colaboración en los momentos difíciles.

Mi agradecimiento al Dr. David Martínez por su asesoramiento en los datos estadísticos.

A los compañeros del Laboratorio de Análisis Clínico-TENEO por su inestimable colaboración en la realización de este trabajo.

Mis agradecimientos a todos los profesores del Departamento por su esfuerzo y empeño en mejorar nuestra formación.

DEDICATORIA

A mi esposa Eugenia, por su tolerancia y amabilidad.

A mis hijos, Johann y Pablo por el cariño y comprensión en los momentos difíciles.

A mis padres, por todo lo que aprendí de ellos.

ÍNDICE

Índice

1.- INTRODUCCIÓN	10
2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO	12
2.1.- Planteamiento	13
2.2.- Hipótesis de Trabajo	13
2.3.- Objetivos	14
3.- MARCADORES BIOLÓGICOS	15
3.1.- Concepto actual de marcador biológico	16
3.2.- Definición de marcador biológico	18
3.3.- Importancia de los marcadores en Medicina Legal	20
3.4.- Aplicación de marcadores en asuntos médico-legales	21
4.- ASPECTOS ACTUALES DEL METABOLISMO DE DROGAS DE ABUSO	23
4.1.- Consideraciones actuales sobre el metabolismo de opiáceos	24
4.1.1.- Introducción	24
4.1.2.- Importancia de la detección de opiáceos en muestras forenses	25
4.1.3.- Metabolismo y Farmacocinética	26
4.1.4.- Heroína	30
4.1.5.- Codeína	34
4.1.6.- Dihidrocodeína	35
4.1.7.- Otros opiáceos	36
4.1.8.- Antagonistas opioides	36
4.1.9.- Folcodina	37
4.1.10.- Farmacología	37
4.1.11.- Métodos de detección	39
4.1.12.- Métodos cromatográficos	41

Índice

4.1.13.- Cromatografía de Gases y Cromatografía de Gases Espectrometría de masas (GC y GC-MS)	42
4.1.14.- Cromatografía Líquida de Alta Eficacia	43
4.1.15.-Técnicas inmunológicas de análisis de opiáceos	43
4.1.16.- Tiempos de detección en inmunoensayos	46
4.1.17.- Interpretación de resultados en inmunoensayos	46
4.2.- Consideraciones actuales sobre el metabolismo del cannabis	50
4.2.1.- Introducción	50
4.2.2.- Farmacología	51
4.2.3.- Metabolismo y Farmacocinética	53
4.2.4.- Métodos de detección	61
4.2.5.- Interpretación de resultados	62
4.3.- Consideraciones actuales sobre el metabolismo de cocaína	63
4.3.1.- Introducción	63
4.3.2.- Farmacología	66
4.3.3.- Metabolismo y Farmacocinética	69
4.3.4.- Métodos de detección	73
4.3.5.- Preparación de la muestra	73
4.3.6.- Cromatografía Líquida de Alta Eficacia(HPLC)	74
4.3.7.- Métodos inmunológicos	75
4.3.8.- Tiempos de detección	76
4.4.- Consideraciones actuales sobre el metabolismo de anfetaminas	78
4.4.1.- Introducción	78
4.4.2.- Metabolismo y Farmacocinética	79

Indice

4.4.3.- Mecanismo de acción	84
4.4.4.- Métodos de detección	84
4.4.5.- Métodos cromatográficos	85
4.4.6.- Cromatografía a gas	86
4.4.7.- Cromatografía a gas-espectrometría de masas	87
4.4.8.- Cromatografía Líquida de Alta Eficacia(HPLC)	88
4.4.9.- Métodos inmunológicos	89
4.4.10.- Técnica de Inmunoensayo Múltiple Enzimático	90
4.4.11.- Inmunoensayo de Fluorescencia Polarizada (FPIA)	91
4.4.12.- Reactividad cruzada de inmunoensayos	91
4.4.13.- Tiempo de detección	92
4.4.14.- Recomendaciones	93
4.5.- Consideraciones actuales sobre el metabolismo de benzodiazepinas	95
4.5.1.- Introducción	95
4.5.2.- Farmacología	97
4.5.3.- Metabolismo y Farmacocinética	99
4.5.4.- Métodos de detección	102
4.5.5.- Métodos inmunoquímicos	102
4.5.6.- Método Cromatográfico a Gas	102
4.5.7.- Interpretación de resultados	103
5.- MATERIAL Y MÉTODOS	104
5.1.- Población	105
5.2.- Aparatos y material	105
5.3.- Reactivos y disoluciones	106

Índice

5.4.- Procedimiento experimental	107
5.5.- Procesamiento de las muestras	109
5.6.- Umbrales de detección	112
6.- MÉTODO DE INMUNOENSAYO DE FLUORESCENCIA POLARIZADA	118
6.1.- Descripción de la técnica	119
6.2.- Aplicación en muestras biológicas de orina	128
6.3.- Screening de cinco drogas de abuso en orina	129
7.- MÉTODO KIM(CINÉTICA DE MICROPARTÍCULA EN SOLUCIÓN)	130
7.1.- Descripción de la técnica	131
7.2.- Aplicación en muestras biológicas de orina	136
7.3.- Screening de cinco drogas de abuso en orina	136
8.- MÉTODO CEDIA(ENZIMOINMUNOENSAYO DONANTE DE ENZIMA CLONADA)	138
8.1.- Descripción de la técnica	138
8.2.- Aplicación en muestras biológicas de orina	143
8.3.- Screening de cinco drogas de abuso en orina	143
9.- MÉTODO CROMATOGRÁFICO A GAS	144
9.1.- Descripción de la técnica	145
9.2.- Aplicación en muestras biológicas de orina	161
9.3.- Determinación de drogas de abuso en orina	161
10.- MÉTODO ESPECTROMÉTRICO	163
10.1.- Descripción de la técnica	164
10.2.- Aplicación en muestras biológicas de orina	171
10.3.- Determinación de drogas de abuso en orina	172
10.4.- Cromatogramas y espectros de masas de las drogas de abuso	172

Índice

11.- LEY DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES	181
12.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	186
12.1.-Screening de drogas de abuso por inmunoensayos y confirmación por gases masas	186
13.- CONCLUSIONES	209
14.- BIBLIOGRAFIA	213

1. - INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los marcadores biológicos han sido utilizados a lo largo de la historia con gran interés desde el punto de vista médico, bien sea para el diagnóstico diferencial y desde el punto de vista médico legal de gran importancia para los exámenes periciales para aclarar la causa de la muerte. Entre otras aplicaciones podemos citar para la utilización en la investigación de imputabilidades sobre determinados hechos en relación con individuos principalmente las derivadas de siniestros laborales.

La investigación de drogas de abuso tanto legales como ilegales tienen una gran tradición en la historia de la medicina legal, y en los últimos años la incorporación de marcadores biológicos bien sea marcadores de lesión, bien sea metabolitos de las drogas en virtud de las nuevas tecnologías, han permitido clarificar muchos problemas concretamente no solamente desde el punto de vista diagnóstico terapéutico, y en aplicaciones tan significativas como la medicina del trabajo y la medicina legal.

Al ser la ciencia forense una aplicación de los principios científicos a los procesos legales, por esta razón se constituye en un auxilio a los jueces en la aportación de pruebas o evidencias que pueden influenciar en la toma de decisiones de los jueces para juzgar o acusar un individuo. El área de drogas de abuso es apenas una de las facetas por las

que la disciplina de la ciencia forense puede actuar, apreciando la composición química de las drogas y correlacionandolas con sus posibles mecanismos de acción y efectos fisiopatológicos que las mismas puedan desencadenar en el individuo.

Debemos llevar en consideración que el estudio analítico de las muestras y la interpretación de resultados deben siempre confrontarse con la clínica del individuo en el contexto global de cada caso en particular, y que el resultado de cualquier análisis no debe solo ser interpretado en el contexto del caso, sino todavía a la luz de las leyes vigentes en cada país, encuancto a control, posesión, manufactura y cultivo de la sustancia tóxica y/o tráfico de la misma, por parte de los individuos involucrados.

Los marcadores biológicos de drogas de abuso ilegales y legales constituyen en la actualidad un desafío a la investigación toxicológica, principalmente debido a que la detección de los metabolitos de estas drogas requieren condiciones especiales para su determinación y análisis, como puede demostrarse através de la historia en numerosos trabajos científicos y cuyas referencias bibliográficas aquí citadas así lo corroboran.

Es extremamente importante que los métodos de análisis sean precisos y regulados preferencialmente con patrones internacionales. La reproducibilidad, exactitud, sensibilidad y especificidad de cualquier técnica analítica debe ser en principio establecida antes de su incorporación a cualquier rutina de laboratorio(1).

2. - HIPOTESIS DE TRABAJO

2.1.- Planteamiento

En la actualidad con el incremento en el consumo de drogas de abuso por parte de los diversos sectores sociales, creemos oportuno y necesario idealizar un diseño de protocolos metodológicos de laboratorio con aplicación objetiva al mundo laboral, particularmente en reconocimientos laborales de nuevo ingreso y en personal de plantilla, con la finalidad de detectar por técnicas de screening presuntos positivos, a seguir someterlos estos a técnicas de confirmación por gases masas(GC-MS), luego discutir y analizar los resultados para ver la utilidad de estos procedimientos y de su aplicabilidad en función de la nueva ley de prevención de riesgos, someter estos criterios a la detección de drogas "in situ", como medida estrictamente preventiva en los puestos de trabajo de elevada responsabilidad, como en conductores de vehículos y manejo de armas en personal de seguridad en las empresas.

2.2.-Hipotesis de Trabajo

Establecer unos marcadores para detectar la exposición a drogas de abuso, en la medida en que estos marcadores derivados del consumo de drogas como cocaína, cannabis y opiáceos , pueden tener una utilidad en la investigación de los usuarios de drogas de abuso desde el punto de vista médico legal y médico laboral.

2.3.- Objetivos

A) Conocer y comparar las frecuencias de positividades a drogas de abuso por Inmunoensayos y sus respectivas confirmaciones por gases masas de muestras de orina de pacientes de población laboral de plantilla, nuevo ingreso y de rehabilitación de drogodependientes.

B) Diseñar un protocolo de método de trabajo para análisis de drogas de abuso en orina como marcadores biológicos de la máxima utilidad, en la aplicación a la exposición de estas, y establecer los criterio de utilización de los marcadores en el contexto médico-laboral.

C) Diseñar la utilidad médico-laboral de los marcadores investigados.

3.- MARCADORES BIOLÓGICOS

3.1.- CONCEPTO ACTUAL DE MARCADOR BIOLÓGICO

Existe en la actualidad un extraordinario interés en desarrollar en laboratorios tests bioquímicos de inmunoensayo en fluidos biológicos, con la finalidad de detectar estados patológicos que caracterizen sin duda alguna estas condiciones, o bien la exposición a determinadas sustancias de abuso que pueden estar involucradas e indirectamente relacionadas con cuestiones médico legales en poblaciones como la laboral o en casos forenses.

Se reconocen 3 tipos de marcadores biológicos, los genéticos, los diagnósticos y los clínicos, que tienen una vasta aplicación en patologías y particularmente para la detección de estados de intoxicación por drogas de abuso por la presencia de metabolitos de estas en fluidos biológicos como la orina. En el caso del marcador genético ni siempre posible de demostrarse, es aquel que cuando positivo en individuos sanos significa predisposición biológica al riesgo de desarrollar un determinado estado patológico. El marcador diagnóstico por otra parte es aquel que se detecta en el estado patológico independientemente del grado de comprometimiento del paciente. Ya el marcador clínico permite detectar condiciones anormales através de la identificación de compuestos en fluidos biológicos capaces de orientarnos con relación a exposición del sujeto a determinados tóxicos o al respecto de la prevalencia del estado fisiopatológico de un órgano en cuestión(2).

La sensibilidad de un marcador relaciona el porcentaje de una población específica de individuos estar acometidos de una enfermedad que tienen positividad en el test de inmunoanálisis y son considerados anormales.

La especificidad de un marcador entretanto consiste en la proporción de los individuos de una determinada población en estudio que no están acometidos de enfermedad y que poseen por tanto test de inmunoanálisis negativos. Particularmente enfatizando en nuestra investigación de la intoxicación por drogas de abuso, podríamos expresarlo a seguir(3):

$$Se = TP / (TP + FN)$$

$$Sp = TN / (TN + FP)$$

Donde Se=sensibilidad, Sp=especificidad, TP=verdaderos positivos, TN=verdaderos negativos, FN=falsos negativos, FP=falsos positivos.

3.2.- DEFINICIÓN DE MARCADOR BIOLÓGICO

Podemos de forma simple expresar que un marcador es una prueba de laboratorio, objetiva, de prestigiosa credibilidad en la actualidad, que cuando realizada con todo rigor y cuidadoso procedimiento analítico nos permitirá obtener resultados mensurables y criteriosos para establecer correlaciones y ser de utilidad para esclarecer cuestiones en el ámbito médico legal en sus distintas facetas, particularmente en lo que se refiere a nuestro estudio, el análisis toxicológico.

Considerando que existe una relación ya demostrada en la actualidad entre consumo de drogas de abuso y diversos estados patológicos desencadenantes de la drogadicción(4), buscamos con los marcadores la detección de alteraciones bioquímicas inducidas por los tóxicos en fluidos biológicos que sean de carácter invariable, repetibles y permanentes que nos aseguren ser consecuencia del uso y exposición prolongado de sustancias extrañas en el organismo.

Por esta razón se proponen diversos parámetros que comentaremos a lo largo de esta exposición, con el propósito de profundar en los mecanismos que controlan y gerencian estas modificaciones(5). Nos encontramos pues con fenómenos como son el grado de variabilidad de la actividad del comportamiento enzimático que sufre influencias directas de la acción de las sustancias de abuso o de sus metabolitos, causando cambios y trastornos metabólicos que degeneran en

lesión celular en la mayoría de las veces, en consecuencia de las reacciones de óxido-reducción que experimenta el tóxico en cuestión en su camino de metabolización y excreción en el organismo, resultando en la génesis de metabolitos que podrán ser bioactivos y por tanto más tóxicos que el compuesto químico inicial.

El marcador es por tanto un parámetro biológico con un grado determinado de sensibilidad y especificidad para determinada enfermedad o estado patológico.

Al interaccionar el tóxico con las membranas celulares y otras macromoléculas, se establece el principio de lesión bioquímica, responsable por las alteraciones fisiológicas y anatomopatológicas. Las consecuencias derivadas del primer contacto del tóxico con las membranas celulares a nivel molecular determina algunos efectos biológicos a partir de las interacciones físico-químicas entre los compuestos químicos (drogas) y moléculas estructurales de los tejidos, como receptores, proteínas, enzimas, etc. siendo consecuencias de modificaciones en el metabolismo celular(6).

3.3.- Importancia de los marcadores en Medicina Legal

Gracias al creciente desarrollo de la ciencia en el campo tecnológico, ha sido posible cada vez más profundizar en la investigación de indicios en la escena de los hechos en actos delictivos, con el objetivo de identificar los autores de los mismos y las causas relacionadas con el evento en si, como la participación e influencia del uso de sustancias de abuso y sus metabolitos a las cuales estuviera expuesto el individuo al cometer el acto ilícito, permitiendo esclarecer através del uso de parámetros biológicos posibles condiciones bajo las cuales el individuo pueda haber sufrido alteraciones bioquímicas y/o trastornos metabólicos que justifiquen su comportamiento bizarro.

Los marcadores en toxicología laboral y forense además de permitir orientarnos con relación a la determinación de la existencia y involucramiento de individuos en el mundo de la drogadicción, juega un papel relevante en la identificación, seguimiento, y rehabilitación de los consumidores de drogas de abuso, como ocurre en los centros especializados en estos tratamientos.

En el caso de óbitos por muertes violentas el análisis y estudio toxicológico forense se torna cada vez más imprescindible en el esclarecimiento y causas de la muerte, aún más en la actualidad con el incremento del uso de drogas de abuso en la sociedad, cada vez más notable en edades más jóvenes y todavía con el surgimiento de las drogas de síntesis

(de diseño) el problema se agrava más. De manera que lo que se pretende con los marcadores es la identificación de las respectivas sustancias de abuso y sus metabolitos en los fluidos biológicos, como medio de comprobar si hubo exposición previa a las mismas, no caracterizando en ningún momento ni drogadicción ni efectos clínicos, el simple hallazgo en orina de estas sustancias.

3.4.- APLICACIÓN DE MARCADORES EN ASUNTOS MÉDICO LEGALES

Existe en la actualidad un arsenal considerable de marcadores bioquímicos en toxicología, para identificaciones patológicas a través de determinación de diversos tipos enzimáticos, así como de la formación de aducidos formados por la combinación de ciertos metabolitos con macromoléculas, como ocurre con el acetaldehído ligado a proteínas, hemoglobina, etc. (7,8,9). También por el surgimiento de metabolitos a partir de bioaminas derivados de bloqueos de mecanismos enzimáticos como ocurre con el etanol, resultando como consecuencia un acentuado aumento en la formación de 5-hidroxitriptofol.

Sin embargo nuestro interés en el estudio de la detección de consumidores de drogas de abuso como opiáceos, cannabis y cocaína por parte de la población laboral tiene mucha importancia por la repercusión en el mundo laboral porque implica en exposición al riesgo de accidentabilidad

laboral y sus consecuencias médico legales que del consumo de estas sustancias pueda derivarse.

**4.- ASPECTOS ACTUALES DEL METABOLISMO DE DROGAS
DE ABUSO**

4.1 CONSIDERACIONES ACTUALES SOBRE EL METABOLISMO DE OPIACEOS

4.1.1 Introducción

Los opiáceos son drogas o compuestos estructuralmente similares a la morfina y con semejante actividad farmacológica. Derivan de las cápsulas inmaduras de la amapola (*Papaver somniferum*). Los opiáceos son utilizados en clínica por su facultad de aliviar el dolor moderado a severo y tienen un amplio rango de efectos farmacológicos difiriendo en potencia por la producción de analgesia, sedación, depresión respiratoria, disminución de la motilidad intestinal y supresión de la tos. El abuso de opiáceos en general causa complejos efectos psicotrópicos y se caracterizan por su capacidad de producir tolerancia y dependencia física con su consumo crónico(10).

La diacetilmorfina (heroína) seguida de una administración intravenosa es rápidamente metabolizada a 6-monoacetilmorfina(6-MAM) en sangre humano como resultado de la hidrólisis enzimática por colinesterasas y luego esta metabolizada a morfina. La presencia de 6-MAM en orina ha sido propuesto como un marcador específico de abuso de la heroína(11). La 6-MAM es excretada en la forma no conjugada en niveles de ng/mL en orina junto con la morfina el mayor metabolito de la heroína(12). La morfina tiene aproximadamente

una potencia media analgésica de la heroína, teniendo propiedades euforizantes semejantes así como produce dependencia(13). Las pruebas forenses para abuso de opiáceos usualmente relacionan la detección y confirmación de codeína y/o morfina en orina(14). La razón codeína/morfina juega un papel relevante en la identificación a la exposición de opiáceos, bien sea a morfina si este coeficiente es < 0.5 , bien sea a codeína cuando esta fracción es > 2 . La morfina al ser el mayor metabolito de ambas drogas de abuso heroína y codeína, su presencia en orina ha sido usado como indicador de uso de opiáceos(15).

4.1.2 Importancia de detección de opiáceos en muestras forenses

La heroína al ser metabolizada rápidamente por hidrólisis a 6-MAM por las esterases plasmáticas, se torna raramente identificable en orinas forenses. No obstante se pueden realizar determinaciones postmortem de 6-MAM utilizando la técnica cromatografía de gases/espectrometría de masas(GC-MS), siendo particularmente imprescindible en las investigaciones forenses como análisis confirmatoria de consumo de heroína en casos implicados en muerte súbita(16). Infelizmente el abuso de heroína no puede ser confirmado por la detección de solo morfina en orina, debido a saberse que la morfina es también excretada en orina después de ingestión de productos de semillas de amapola(17,12). Por otra parte la toma de codeína también conduce a la presencia de morfina en orina. Sin embargo la evidencia inequívoca de abuso de heroína puede

obtenerse a través de la detección en orina de la 6-MAM, la cual no es encontrada en semillas de amapola y no es un producto del metabolismo de la morfina o codeína(12).

La codeína es otro opiáceo prescrito de forma terapéutica que hace parte de la composición de jarabes antitusígenos y puede ser detectado en análisis de orina, así como debemos recordar que el hallazgo de semillas de amapola usadas en la preparación de algunos tipos de pan contienen pequeñas cantidades de opiáceos, apesar de que en estos casos las cantidades de opiáceos excretadas en orina son bajas(10).

Una vez administrada la codeína esta es metabolizada a morfina, siendo excretada en forma libre y conjugada con ácido glucurónico, pero la cantidad relativa es pequeña comparada a la cantidad total de codeína excretada. De forma general en todos los estudios donde se hace referencia a la excreción de codeína en orina esta procede de una administración oral de la codeína, aunque la codeína puede también ser abusada por vía parenteral(14).

4.1.3 Metabolismo y Farmacocinética

La morfina es uno de los más poderosos analgésicos para controlar y aliviar el dolor severo. Es rápidamente absorbido del tracto Gastrointestinal pero sufre una metabolización importante de primer paso al alcanzar el hígado, siendo posterior a esta su disponibilidad sistémica variando entre 15

y 70% en media 40%. Es ampliamente metabolizada por conjugación con ácido glucurónico. La morfina-3-glucurónido es el principal metabolito de la morfina encontrado en orina, aproximadamente 50%. Cerca de 15% de la dosis de morfina administrada puede ser encontrada en la orina de forma libre, inalterada. Otros metabolitos menores de morfina que pueden identificarse son: morfina-6-glucurónido, morfina-3, 6-diglucurónido, normorfina, normorfina-3-eter sulfato y normorfina-6-glucurónido(tabla 1)(10).

Por otra parte la codeina puede producir metabolitos de morfina (3-O-metilación). Estudios recientes han comprobado que seguidas repetidas dosis de morfina los metabolitos morfina 3 y 6-glucuronidos son observadas en plasma, siendo la forma morfina-6-glucurónido de singular importancia por mostrar potente efecto analgésico, mucho mayor que la morfina, en contrapartida el metabolito morfina-3-glucuronido siendo el principal metabolito de la morfina es farmacológicamente inactivo.(figura 1)(10).

Los Opiáceos pueden ser administrados por vía oral o parenteral tras una administración oral su absorción es lenta y su biodisponibilidad tiende a disminuir debido a sufrir efecto del primer paso hepático. La vida media de la morfina varía en torno a las 2 hs, ya su metabolito activo la M6G algo más. Al atravesar la barrera hematoencefálica los opiáceos ejercen sus efectos a nivel de receptores opioides (μ , δ , κ y σ), estimulando centros bulbares y

vestibulares fundamentalmente entre otros, causando alteraciones del estado anímico y analgesia. Los opiáceos por ser drogas de adicción su actuación como droga ilegal se fundamenta en que produce euforia y sensación de bienestar muy relacionadas con el poder adictivo(14).

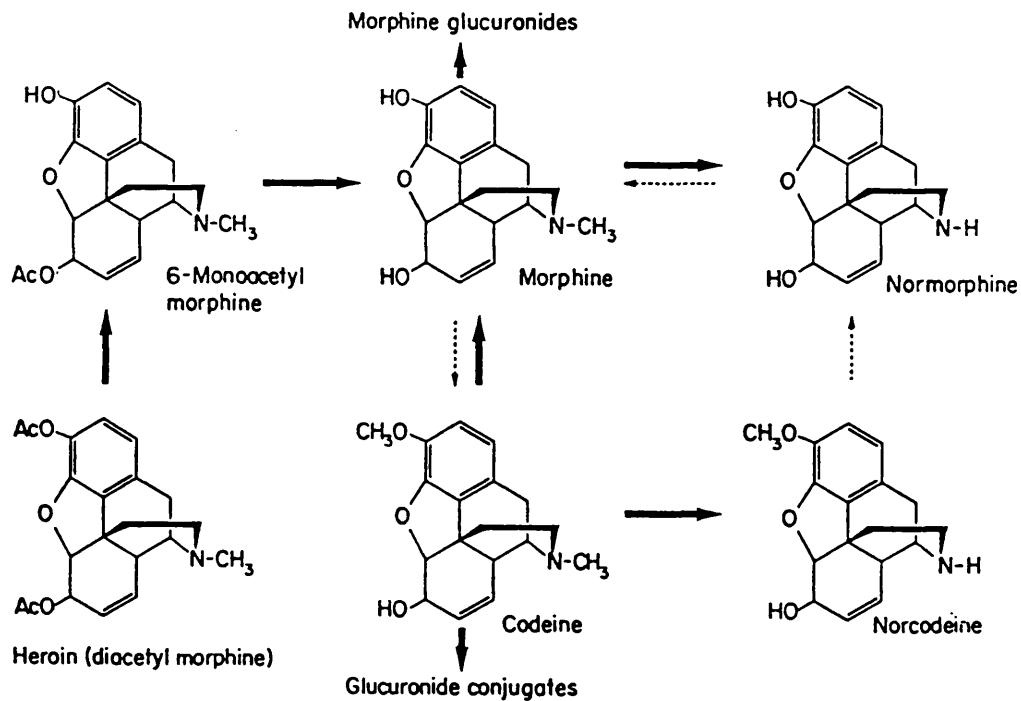


Figura 1. Vía metabólica de la morfina y drogas relacionadas. Tomado de Braithwaite et al.(10)

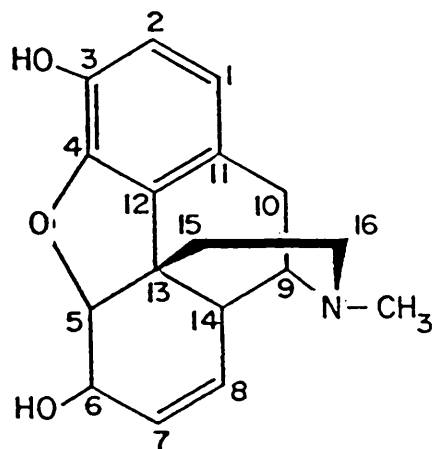


Figura 2. Estructura química de la morfina

Name	Positional modification of morphine structure			
	3	6	17	Other changes
Morphine	-OH	-OH	-CH ₃	—
6-Monoacetyl morphine	-OH	-OCOCH ₃	-CH ₃	—
Morphine-3-Glucuronide	-O-Gluc	-OH	-CH ₃	—
Morphine-6-Glucuronide	-OH	-O-Gluc	-CH ₃	—
Diamorphine (heroin)	-OCOCH ₃	-OCOCH ₃	-CH ₃	—
Codeine	-OCH ₃	-OH	-CH ₃	—
Norcodeine	-OCH ₃	-OH	-H	—
Normorphine	-OH	-OH	-H	—
Dihydrocodeine	-OCH ₃	-OH	-CH ₃	•
Dihydromorphine	-OH	-OH	-CH ₃	•
Hydromorphone	-OH	=O	-CH ₃	•
Oxymorphone	-OH	=O	-CH ₃	•†
Hydrocodone	-OCH ₃	=O	-CH ₃	•
Oxycodone	-OCH ₃	=O	-CH ₃	•†
Nalorphine	-OH	-OH	-CH ₂ CH=CH ₂	—
Naloxone	-OH	=O	-CH ₂ CH=CH ₂	•†
Naltrexone	-OH	=O	-CH ₂ ◀	•†
Nalbuphine	-OH	-OH	-CH ₂ ◊	•†
Pholcodine	-O-CH ₂ -CH ₂ -N ₂ O	-OH	-CH ₃	—
Buprenorphine	-OH	-OCH ₃	-CH ₂ ◀	•‡

*Single instead of double bond between C7 and C8.

†OH at C14.

‡Endoethene bridge between C6 and C14; 1-hydroxy-1,2,2-trimethylpropyl substitution on C7.

Tabla 1. Estructuras químicas de la morfina y compuestos relacionados. Tomado de Ann.Clin.Biochem.1995,32.(10)

4.1.4 HEROINA (DIACETILMORFINA)

La heroína es todavía usada como un analgésico y puede ser administrado oralmente o por vía subcutánea o intravenosa. Apesar de que el mayor efecto analgésico es potenciado debido a su conversión a morfina, la heroína al ser más lipofílica impregna el cerebro más rápidamente. Como resultado los efectos euforizantes son mayores que los de la morfina, y por esta razón la heroína es preferida por los adictos particularmente por inyecciones intravenosas. El mayor abuso es relacionado a preparaciones ilícitas callejeras de drogas.

La heroína de la calle es conocida como golpe, baratija blanca, y H es una cruda mezcla diluida conteniendo una cantidad de heroína, la cual típicamente puede ser 30-50% pero puede ser tan baja como el 5%. En la mayoría de los casos la heroína ha sido prediluida(cortada) con una variedad de otros materiales tales como, tiza, almidón, y ácido cítrico y puede ser adulterado desde su origen con drogas como fenobarbital, quinina, y cloroquina. La heroína de la calle puede ser tomada oralmente, por inyección intravenosa o por inhalación (snifada) de vapores. El abuso de la heroína es variable a veces puede progresar de una simple dosis de 10mg a la dependencia a severas cantidades por semana(10).

En relación al metabolismo de la diacetilmorfina el 80% de una dosis de heroína es excretada en su mayor parte como morfina conjugada con ácido glucurónico y otra pequeña parte

como morfina libre por procesos enzimático y químicos, apenas 1% se excreta en la forma de 6-MAM debido a sufrir una metabolización veloz a morfina(18,19). La morfina es además metabolizada por conjugación a morfina glucurónido y por demetilación a normorfina. La morfina y su conjugado de morfina, la morfina-6-glucurónido y morfina-3-glucurónido son los metabolitos primarios de la heroína encontrados en orina, mas la heroína y 6-MAM están presentes en un corto período de tiempo después de la administración de la droga(19,1). En condiciones normales cifras mayores al 90% de excreción total de morfina se metabolizan en 24 hs. después de la administración de morfina, pudiendo encontrarse trazas de morfina días después de la última dosis, probablemente por mecanismo de recirculación enterohepática, siendo en torno de 7-10% la morfina excretada a través de la bilis(21).

La morfina por su vez es conjugada con ácido glucurónido y forma metabolitos activos y inactivos, siendo la M6G el metabolito de mayor importancia y el de mayor potencia farmacológica, ya el metabolito M3G es la forma más abundante en sangre y orina, pero es farmacologicamente inactivo(20).

La estructura química de la heroína en relación a la morfina es mostrada en figura 1(10). In vivo la heroína es rapidamente diacetilada por las esterases sanguineas para originar la 6-MAM(monoacetilmorfina), la cual además es hidrolizada por enzimas hepáticas a morfina. La morfina es entonces el principal metabolito detectado en orina de los usuarios de heroína, lo cual hace difícil distinguir entre

usuarios de morfina y heroína. La heroína de la calle puede también contener acetilcodeína, la cual es metabolizada a codeína. Cuando en muestras de orina contiene relativamente baja cantidad de codeína y morfina, es posible diferenciar entre ingesta de heroína, morfina o codeína utilizando técnicas de rutina. La presencia de 6-MAM lo cual puede algunas veces ser encontrada en orina indica abuso de heroína. La propia heroína es raramente encontrada en cualquier fluido corporal(10).

El opio bruto o crudo(no procesado) es producido del zumo coagulado de la amapola *Papaver somniferum*, la cual se forma del latex expuesto a seco por algunas horas, adquiriendo una coloración viscosa marrón. Los residuos de la cápsula de semillas constituyen la resina y rica fuente de alcaloides opiáceos. Las resinas de plantas de diferentes regiones geográficas son caracterizadas por diferentes proporciones de alcaloides opiáceos(1,21). Toda la diacetilmorfina originada del opio es preparada por la acetilación de morfina, obtenido del opio. El proceso de extracción y acetilación comunmente empleadas en la morfina resultan en la producción de un número de drogas opiáceas figura 3(1).

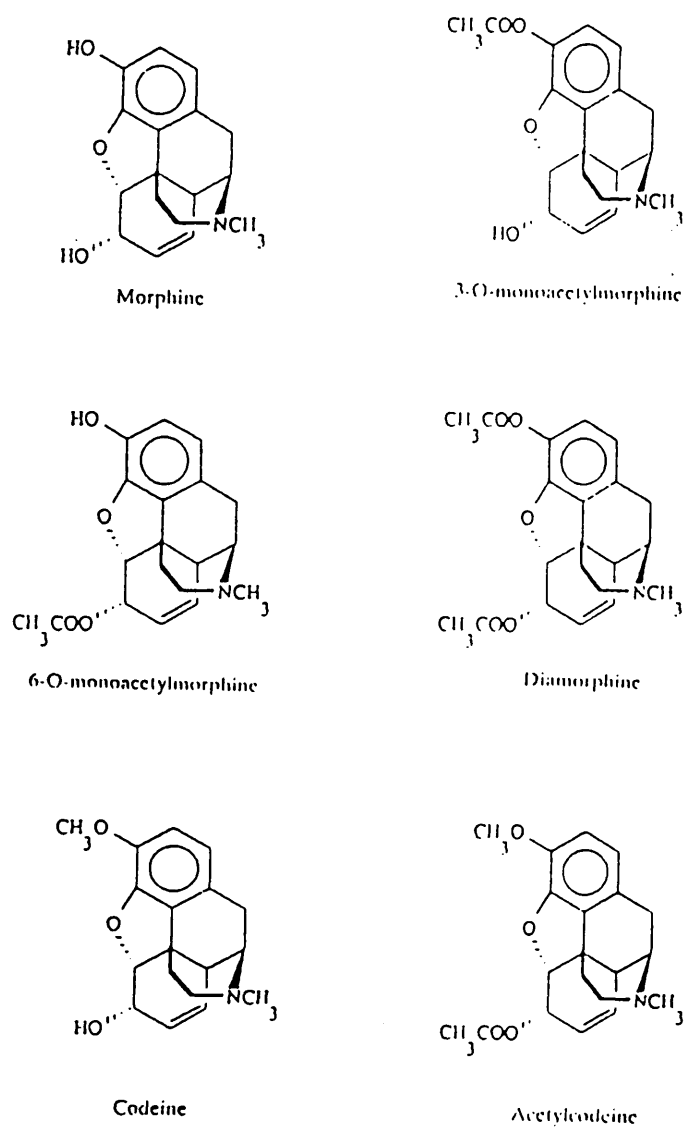


Figura 3. Ejemplos de opiáceos encontrados en Opio. Tomado de COLE, D.M. (1)

4.1.5 CODEINA

La codeina está lejos de ser un potente analgésico como la heroína o morfina y por esta razón no es una droga controlada. Numerosas preparaciones contienen en sus propiedades pequeñas cantidades de codeina en combinación con analgésicos tales como el paracetamol o aspirina, pudiendo ser obtenidos sin prescripción médica. Por esta razón se ha generalizado el abuso de las preparaciones que contienen codeina por mal uso de opiáceos. La codeina está también presente en semillas de amapola y es un contaminante de la heroína ilícita .

La codeina metabolizada en el hígado fundamentalmente a 6-codeina-glucurónido, es eliminada del organismo humano en la orina, siendo una pequeña fracción 10-15% de la dosis de codeina demetilada a morfina, pudiendo encontrarse morfina libre o conjugada en orina de un individuo tras administración de codeina(18). Por proceso de 3-O-demetilación la codeina pasa a morfina, y a norcodeina por N-demetilación, ver figura1(10). Más del 80% de una dosis oral de codeina es excretada en la orina, como droga libre(5-17%), codeina-glucurónido y conjugados sulfatos(32-64%), conjugados norcodeina(10-21%) y conjugados de morfina(5-13%). Pequeñas cantidades de morfina libre y norcodeina puede también ser encontrados en la orina. Durante la temprana fase de excreción predominan conjugados de codeina, pero aumenta seguido un período de 20-40hs conjugados de morfina, favoreciendo la mayor excreción de estos productos. Existe

una gran variabilidad interindividual en la conversión metabólica de codeína a morfina y la razón cambiante de morfina a codeína durante la excreción, siendo que las proporciones codeína-morfina encontradas en las determinaciones analíticas urinarias orientarían en relación al tipo de opiáceos al que el individuo a estado expuesto. Una muestra de orina colectada 2-3 días después de ingesta de codeína puede aparecer conteniendo sólo morfina y esto puede representar un problema de interpretación(10).

4.1.6 DIHIDROCODEINA (DF118)

La dihidrocodeína es un producto que se encuentra entre codeína y morfina en su potencia analgésica y su estructura en relación a morfina(tabla 1).

La droga está disponible sólo con prescripción facultativa, pero se puede encontrar en combinación con otros analgésicos como el paracetamol.

El metabolismo y excreción de dihidrocodeína es mal comprendido, pero la principal ruta es la conjugación con ácido glucurónico y sulfato con conversiones variables por 3-o-demetilación a dihidromorfina y sus conjugados y N-demetilación a nordihidrocodeína(figura 4). A diferencia de la codeína la droga no es metabolizada a morfina(10).

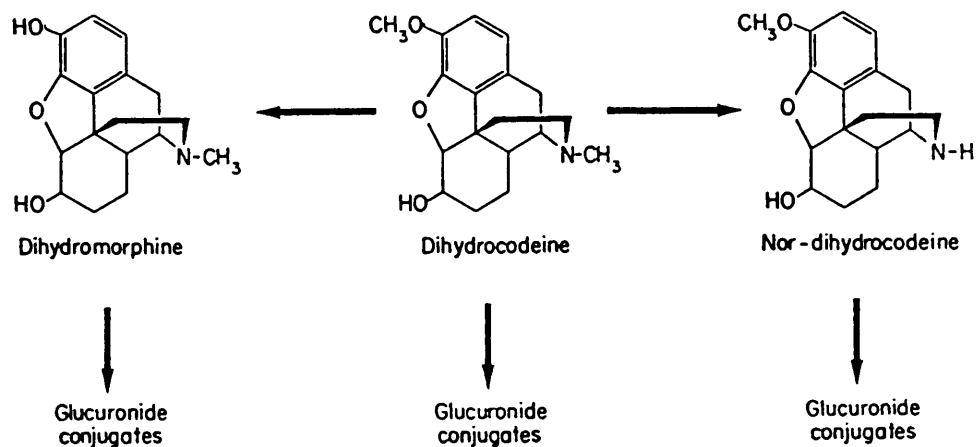


Figura 4. Vía metabólica de la dihidrocodeína. Tomado de Braithwaite et al. (10)

4.1.7 OTROS OPIÁCEOS

Algunos opiáceos tales como hidromorfona, oximorfona, hidrocodona, y oxicodona no son usados clínicamente, son usados como suministros ilícitos por drogodependientes, no siendo fácilmente disponibles.

4.1.8 ANTAGONISTAS OPIOIDES

Los antagonistas opioides tales como nalorfina, naloxona y nalbufina (tabla 1) tienen un pequeño potencial para abuso, pero pueden ser administrados a pacientes en la profilaxis y desintoxicación de abuso de opiáceos. Estas drogas y sus metabolitos deben por lo tanto estar presentes en muestras de

sangre o orina de tales pacientes y pueden interferir en tests destinados a detectar opiáceos(10).

4.1.9 FOLCODINA

La folcodina es un análogo de la morfina (tabla 1) usado en un número de preparaciones por sus propiedades antitusígenas como supresión de la tos. Existe una venta irrestricta y no potencia abuso. Pacientes tomando estos productos pueden dar resultados positivos para opiáceos en algunos test inmunológicos que se encuentran en orina. Debido a este bajo aclaramiento renal las muestras pueden quedar positivas a opiáceos, por lo mínimo una semana seguido de la cesación de la dosis de folcodina(10).

4.1.10 FARMACOLOGIA

Los opiáceos actúan sobre receptores cerebrales específicos localizados y distribuidos en el área Tegmental Ventral, Sustancia negra mesencefálica, hipotálamo, Núcleo accumbens, Núcleo pálido y Amígdala fundamentalmente.

La morfina es un agonista específico para los receptores $\mu(m)$, y actúan también sobre receptores $\delta(d)$, $\kappa(k)$ y σ , sitios implicados en la génesis de la adicción y mantenimiento de la propiedad adictógena. La activación y estimulación de receptores induce a un aumento de la conductancia de potasio en la célula, inhibiendo la liberación

de neurotransmisores, siendo posiblemente este mecanismo el responsable por la mayoría de los efectos producidos en la administración de opiáceos. En virtud de existir una malla integradora o red de receptores relacionados entre sí además de los anteriormente citados los receptores GABA, alfa-2 adrenérgicos y M2 muscarínicos, los varios neurotransmisores al compartir un mismo sistema de canales de potasio justificaría las acciones analgésicas de los agonistas para los receptores alfa-2 adrenérgicos.

A nivel de receptores mu los opiáceos causan inhibición de la adenilato ciclasa que conlleva a una disminución de la concentración de AMPc y a la alteración de la actividad de diversas proteínas en la capacidad de transcripción de genes, pudiendo generar disturbios en la transcripción de genes que codifican péptidos opioides(endorfinas) ocasionando reducción de la disponibilidad de estas endorfinas en las neuronas alterando su funcionalidad. No obstante tras exposición crónica de morfina ocurre una respuesta homeostática que se caracteriza por alteraciones moleculares no observándose más disminución del AMPc, produciéndose elevación de los niveles de Adenilato ciclasa con el consecuente surgimiento de tolerancia para los efectos de la droga debido a modificaciones estructurales en la plasticidad de los receptores mu por desacoplamiento de proteínas G.

Los opiáceos al tener propiedades psicoestimulantes la euforia que ocasionan tras su consumo es debido a su actuación sobre el sistema de recompensa, la vía dopaminérgica

mesolímbica en el área Tegmental Ventral, produciendo liberación de dopamina en el Núcleo accumbens, donde existen neuronas Gabaérgicas con receptores μ , en donde la hiperpolarización de estas neuronas causa reducción de la liberación de GABA sobre las neuronas dopaminérgicas, contribuyendo al incremento de la actividad de las células dopaminérgicas.

El abuso repetitivo de administración de opiáceos conduce a tolerancia o sensibilización de los efectos sobre los receptores opioides a nivel comportamental relacionados al parecer con la activación en el área Tegmental Ventral de las neuronas dopaminérgicas(22).

4.1.11 MÉTODOS DE DETECCIÓN

Existe una necesidad de los laboratorios estar provistos de métodos sensibles para la detección de opiáceos y para la identificación y confirmación de opiáceos. Es importante diferenciar entre abuso de heroína, dihidrocodeína, y mal uso de fármacos, y el uso de codeína y folcodeína.

Una de las dificultades en la detección y confirmación de abuso de opiáceos es la similaridad estructural entre morfina y sus muchos congéneris (tabla 1).

Algunos opiáceos tales como heroína (diamorfina) y morfina son sustancias controladas, y donde otras tales como codeína son disponibles en forma diluida sin prescripción.

La presencia de una sustancia parecida a opiáceos en orina

de pacientes no es por lo tanto prueba suficiente de abuso de heroína. Además opiáceos tales como heroína, morfina y codeína, dividen en común las vías de metabolismo (figura 1). La morfina puede ser detectada en orina seguido de la ingesta de todas las 3 drogas. El hallazgo de 6-acetilmorfina en orina es sólo la inequívoca prueba de uso de heroína, pero la presencia de elevadas concentraciones de morfina libre o conjugada generalmente indica reciente uso de heroína o morfina. La presencia de bajas concentraciones de morfina en muestras de orina es mucho más difícil de interpretar, particularmente cuando codeína es también detectada.

La detección de dehidrocodeína sólo en orina es evidencia de su uso. El uso médico o uso ilícito de otros menos bien conocidos opiáceos o antagonistas de morfina causa además dificultades para el laboratorio, particularmente si relativamente los métodos de detección utilizados no son específicos.

Elegir la técnica de determinación para abuso de opiáceos es también influenciada por factores tales como disponibilidad de personal experimentado, disponibilidad de capital para adquirir equipamientos y coste de reactivos.

4.1.12 METODOS CROMATOGRAFICOS

La cromatografía en capa fina (TLC) es ampliamente usada en procedimientos cromatográficos para detección de opiáceos. Tales procedimientos basados en previa fase de extracción líquida o sólida de muestras de orina son usadas para detectar comunmente opiáceos y algunos de sus metabolitos en concentraciones por encima aproximadamente de 1 mg/mL (10).

En muchos métodos la orina es extraída a pH=8-9 sin hidrólisis para optimizar la recuperación de morfina sin extracción de conjugados glucurónidos o sulfatos más solubles en agua. La no utilización de la hidrólisis de las muestras de orina disminuye la sensibilidad del procedimiento particularmente para la detección de morfina, la cual está principalmente presente en orina unido al 3-glucurónido. Previa hidrólisis de muestras de orina puede ser transportado por calor con ácido fuerte o por tratamiento con betaglucuronidasa, siendo esta añadida durante un tiempo considerable para que se produzca la reacción de hidrólisis ácida en caso de la primera o hidrólisis enzimática en caso de la segunda alternativa. La presencia de morfina sin hidrolizar en muestras de orina está generalmente asociado con reciente uso de heroína, mientras que las muestras detectadas con morfina seguida la hidrólisis indica menor posibilidad de ingesta reciente. Un procedimiento alternativo es hidrolizar sólo las muestras que están positivas en inmunoensayo.

Con la cromatografía de capa fina de alta eficacia (HPTLC)

es una técnica más refinada de la TLC, más rápida y sensible. Los extractos pueden ser aplicados con un muestreador automatizado y las drogas acto seguido pueden ser cuantificadas por densitometria(10).

4.1.13 Cromatografía a Gas y Cromatografía a Gas-Espectrometría de Masas (GC Y GC-MS)

La cromatografía a gas capilar sólo o en combinación con espectrometría de masa, ha sido usada para indentificar morfina y sus congéneris en fluidos biológicos. En laboratorio con experiencia de GC, es una técnica de confianza para la confirmación de opiáceos en muestras de orina encontradas estas positivas para opiáceos por inmunoensayo.

La combinación de GC con MS es una técnica particularmente poderosa para la identificación inequívoca de opiáceos. La monitorización selectiva iónica(SIM) provee suficiente sensibilidad para la confirmación de resultados de inmunoensayos bajo umbrales de concentración de 300 ug/L. En particular si ha sido usado para la identificación de 6 MAM en orina con evidencia inambigua de ingesta de heroína. Las técnicas de derivatización tales como trimetilsililación son necesarias para producir compuestos con buenas propiedades cromatográficas y características de espectro de masa de ionización de electrones. La desventaja de tales técnicas son relativamente elevado costo de los equipamientos y el demorado tiempo de análisis(10).

4.1.14 Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

En años recientes se han descrito un largo número de técnicas de HPLC para determinación cualitativa y cuantitativa de opiáceos en fluidos biológicos, generalmente con el uso de detección electroquímica la cual es capaz de incrementar la sensibilidad y selectividad. Sin embargo las técnicas de HPLC son en la actualidad de pequeña utilidad en laboratorios de rutina, tanto para determinación preliminares o para confirmación de opiáceos en muestras de orina encontradas ser positivas para opiáceos por inmunoensayo. Es quizá decepcionante esta técnica en vista de la escasa habilidad en resolver ambas formas de opiáceos la libre y la conjugada. La mayor desventaja de aplicación de esta técnica es el elevado costo y el requerimiento de pericia para su operación, y el relativo demorado tiempo de análisis.

4.1.15 Técnicas Inmunológicas de Análisis de Opiáceos

Los inmunoensayos para ambas análisis el cualitativo y cuantitativo de opiáceos están comercialmente disponibles y son basadas en una de las 4 principales técnicas: 1- Técnica de Inmunoensayo Múltiple Enzimático(EMIT), 2-Inhibición de hemaglutinación, 3- Inmunoensayo de Fluorescencia Polarizada(FPIA), 4- RIA inmunoensayos. Difieren todas ellas ampliamente en sensibilidad y reactividades cruzadas a morfina y otros opiáceos (tabla 2).

La sensibilidad de estos ensayos varia considerablemente. En situaciones reales puede ser más complejo debido a diferente reactividad cruzada respecto a morfina-3-glucurónido o otros opiáceos y sus metabolitos. Estos ensayos específicos son además menos útiles como investigación preliminar para uso de opiáceos, y son más apropiados para estudios farmacocinéticos de morfina o para el análisis cuantitativo de morfina en muestras forenses.

En un estudio realizado en muestras de orina colectadas después de administración conocida de dosis de heroína, morfina y codeína fueron testados inmunoensayos para opiáceos de Abbott TDX, Roche Abuscreen y Syva EMIT. Los resultados cuantitativos fueron comparados con resultados con Gases Masa(GC/MS). Los resultados estuvieron bien correlacionados con gases masa sobre un amplio rango de concentración. Hubo sustancial variabilidad en resultados de codeína por inmunoensayo. Un inmunoensayo simple barato basado en inhibición de hemaglutinación(HT) usa viales sellados con eritrocitos congelados a seco recubiertos con anticuerpos. El test es cargado por reconstitución del vial contenido con agua, añadiendo un pequeño volumen de muestra de orina y observando la sedimentación del patrón una hora más tarde. El test es bastante sensible para morfina, metabolitos de morfina y otros opiáceos, tales como codeína, y dihidrocodeína. Sin embargo el procedimiento puede algunas veces fallar si las instrucciones del manipulador del test no son seguidas exactamente. Han ocurrido también problemas con la calidad

de ciertos lotes de reactivos y resultados ambos falsos positivos y falsos negativos pueden obtenerse. Debido a esto este sistema no goza de confianza y no puede ser recomendado como un procedimiento de investigación para opiáceos.

Assay	Syva*	Syva*	Abbott**	PE ¹	PE ¹	Roche ¹	DPL ¹	DPL ¹
	EMIT-d.a.u opiate	EMIT-st opiate	ADx/TDx opiate	PFI-20 opiate	PFI-20 morphine	Abuscreen morphine	Coat-a-Count morphine (serum)	Coat-a-Count morphine (urine)
Technique	EMIT	EMIT	FPIA	FPIA	FPIA	RIA	RIA	RIA
Sample	Urine	Urine	Urine	Urine	Urine	Urine/blood	Serum	Urine
Opiate cross-reactivity								
Morphine	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Morphine-3-glucuronide	24%	33%	47%	48%	0.001%	80%	0.04%	0.2%
Normorphine	0.5%	—	4%	—	—	—	9.5%	—
Codeine	104%	100%	127%	217%	0.001%	110%	0.06%	0.2%
Dihydrocodeine	93%	—	48%	132%	0.001%	—	0.05%	—
Qualitative cut-off (µg/L morphine) ¹	300	500	200	10 000	1000	40	25	25

*Syva UK Ltd, Maidenhead, UK.

**Abbott Diagnostics Division UK Ltd, Maidenhead, UK.

¹PE = Perkin-Elmer Ltd, High Wycombe, UK.

¹Roche Diagnostics, Welwyn Garden City, UK.

¹DPL, Llanberis, UK.

¹Differentiation between 'positive' and 'negative' opiate.

EMIT = Enzyme-multiplied immunoassay technique; FPIA = fluorescence polarization immunoassay; RIA = radioimmunoassay.

Tabla 2. Relativa reactividad cruzada entre inmunoensayos de opiáceos. Tomado de Braithwaite et al.(10)

La hidrólisis de muestras libera conjugados de morfina previa extracción que puede mejorar la realización de la cromatografía en capa fina, pero sin embargo la HPTLC (cromatografía de capa fina de alta eficacia) podría ser más apropiada. De preferencia HPLC, GC capilar con detección nitrógeno fósforo o GC-MS. Las muestras positivas por

inmunoensayos pueden ser de forma más potente confirmadas por técnicas cromatográficas.

4.1.16 TIEMPOS DE DETECCIÓN EN INMUNOENSAYOS

El tiempo de detección medio en general en las reacciones cruzadas inmunoensayos TDX, Abuscreen y EMIT es de 15 a 44 hs tienen nivel de umbral de 300 ug/L , después de la administración de heroína y morfina y 33 - 54 hs después de administración de codeína(10).

4.1.17 Interpretación de resultados en Inmunoensayos

El procedimiento recomendado para la detección preliminar y confirmación de opiáceos en muestras de orina de drogas de abuso requiere la aplicación de lo mínimo dos diferentes técnicas, para la detección preliminar en muestras de orina se prefiere un rápido inmunoensayo isotópico de reacción cruzada con todos los opiáceos comunes(morfina, codeína, y dihidrocodeína) y sus metabolitos. Los dos ensayos más disponibles son el EMIT ensayo de opiáceos con umbral de 300 ug/L o el ensayo FPIA con umbral de 200 ug/L. La elección entre estas dos técnicas dependerá de la carga de trabajo del laboratorio y la disponibilidad de existencia de instrumentación.

El procedimiento por el sistema Toxi-lab TLC tiene ventaja de ser barato y puede usarse para la detección de opiáceos.

Sin embargo la sensibilidad es más pobre que la técnica de inmunoensayo. El uso de GC capilar sólo o combinada con espectrometría de masa es un procedimiento de confianza para confirmación de la presencia específica de opiáceos(10).

Las pruebas en orina para opiáceos generalmente dependen de la detección de morfina total y del hallazgo entre la suma de la morfina libre(inalterada) y la morfina conjugada. No obstante el procedimiento no es específico para la heroína, porque la morfina puede estar presente como resultado de toma de heroína, morfina, codeína o incluso por ingesta de semillas de amapola. El legítimo uso de codeína puede usualmente ser distinguido por la presencia de una elevada relación o cociente de codeína/morfina en orina, aunque puede ser algunas veces limitado cuando solo la morfina es detectable después de administración de codeína(13). Por otra parte después de la administración de heroína o de la ingesta de semillas de amapola, predominan los metabolitos de la morfina en la forma libre y conjugada, visto que la codeína está presente en mucho menos cantidad. Intentos se han realizado para determinar cual tipo de opiáceo fue administrado basado en la abundancia de morfina o codeína en orina, pero existen problemas en este intento simplista de acercarse a una correcta interpretación, primero porque la simple presencia de codeína en orina no indica que la codeína ha sido usada de forma abusiva, o sea que no se puede asegurar que haya ocurrido abuso de la codeína, porque puede haber sido introducida en el organismo como contaminante de la heroína o por consumo de semillas de

amapola. En segundo lugar la ingesta de codeína de forma oral se metaboliza rápidamente a morfina(14).

La diferenciación o distinción entre toma de heroína, morfina, o ingesta de semillas de amapola requiere estrategias adicionales entre las cuales podrían incluirse ensayos para un marcador específico para heroína la 6-MAM y la evaluación de signos clínicos de abuso de opiáceos. La codeína es detectada frecuentemente en la orina de usuarios de heroína, pero su presencia es fácilmente atribuible a impurezas, siendo esto demostrado claramente por (SIM) monitorización iónica selectiva(13). No obstante tres factores relevantes deben llevarse en consideración siempre que se interpreten resultados de pruebas de opiáceos: 1- la contaminación de heroína por codeína, 2- la presencia de morfina y codeína en semillas de amapola, y 3- la diferencia en las razones o cocientes de las tasas de excreción urinaria de codeína/morfina. Las muestras de orina colectadas durante la última fase de eliminación de opiáceos conteniendo solo morfina o una razón de morfina/codeína elevada, permitirán asegurar que la presencia de morfina y la ausencia de codeína puede no ser un válido indicador de administración de morfina o heroína, sino que puede sugerir que ocurrió administración de codeína. En estos casos la interpretación de resultados analíticos forenses de opiáceos requieren una comprensión de la cinética de eliminación de ambas formas libre y conjugada de los metabolitos de la droga, siendo imprescindible el estudio de las varias rutas de administración de la droga como

factor que dependa e influencie el metabolismo de la droga(14).

4.2 CONSIDERACIONES ACTUALES SOBRE EL METABOLISMO DEL CANNABIS

4.2.1 INTRODUCCIÓN

El cannabis o cañamo índico es una planta (*Cannabis sativa*), que contiene muchos compuestos químicos entre los que se destaca el Delta-9-THC psicotrópico primario. La resina del cañamo denominada hashis que se consume ordinariamente fumada es más enriquecida en este principio activo(23), cuya principal actividad farmacológica lo constituye el delta-9-tetrahidrocannabinol, que es un compuesto inestable y considerado un precursor del cannabinol(CBN)(1).

La planta del cañamo fue utilizada secularmente por las culturas orientales y diversas sociedades como una poderosa sustancia psicoactiva alucinógena(22,24). El cannabis es un vegetal que cresce de forma silvestre o por cultivos en zonas tropicales y templadas. Es una planta dioica que cresce por separado plantas macho y hembra(1), siendo responsables por las propiedades psicoactivas del cannabis las flores y hojas adyacentes de ambas plantas hembra y macho.

El principal componente psicoactivo de la marihuana es el delta-9-THC, no obstante este vegetal tiene más de 60 componentes denominados cannabinoides(18), siendo para la mayoría de ellos desconocidos en el organismo sus efectos fisiológicos y no poseen propiedades psicoactivas. Se consume preferiblemente fumandola a partir del preparo de las flores y

hojas secas de la planta Cannabis sativa, variando en concentración de principio activo según la cepa entre 1 y 14% de THC. Otra variedad es el preparado de la resina segregada de las hojas del Cannabis o a partir del hervido de la misma, cuya potencia de principio activo oscila entre 10-20% de THC. Otra modalidad de preparado es a partir de la destilación de este vegetal en disolventes orgánicos, potenciando una mayor concentración de principio activo de THC entre 15 y 30%(25,26).

4.2.2 FARMACOLOGIA

Los efectos farmacológicos del delta-9-THC varían con la dosis, la vía de administración, la experiencia del usuario y la vulnerabilidad a los efectos psicoactivos dentro del marco de esta adicción. Los efectos derivan directamente de la dosis suministrada variando en los casos más severos de intoxicación por reacción adversa a la droga desde una reacción psicótica con toda una gama de trastornos del intelecto, pasando por una sensación de euforia, relajación, somnolencia a moderadas alteraciones de la percepción y de la noción del tiempo y el espacio(21). La intoxicación con marihuana produce cambios en el humor, percepción y motivación, sin embargo los efectos buscados por la mayoría de los usuarios es la levitación y sensación de suavidad. Los efectos varían con la dosis, siendo en el caso de la marihuana fumada de una duración de 2 horas. Durante este tiempo ocurre

una disminución de las funciones cognitivas, de la percepción, del aprendizaje y alteraciones en la memoria. También surgen prejuicios sobre la coordinación motora y el comportamiento de forma transitoria, que persisten algunas horas con obvias implicaciones en el rendimiento y la calidad en la productividad laboral muy particularmente en la operación y manejo de vehículos motores. Las alteraciones comportamentales producidas por el consumo de la marihuana son complejas, tales como vértigo, y aumento del apetito. Si bien se han referido por parte de usuarios de esta droga aumento del placer sexual y de la perspicacia. Reacciones desagradables pueden ocurrir tales como pánico o alucinaciones hasta psicosis aguda, siendo referido un mínimo de ansiedad en un 60% de los usuarios de marihuana.

Estas reacciones comunmente parecen ser con elevadas dosis y relacionadas con el consumo oral de la hierba, que de la marihuana fumada, debido a que el fumar la droga permite una regulación de las dosis de acuerdo a los efectos. No hay evidencias convincentes que la marihuana pueda producir por último síndrome pseudoesquizofrénico. No obstante existen numerosos informes clínicos que se inclinan hacia la marihuana ser capaz de precipitar el surgimiento de la esquizofrenia en personas predispuestas o con antecedentes de esta enfermedad.

Uso de los efectos más controvertidos y contestados es la producción de un síndrome amotivacional. Este síndrome no está diagnosticado oficialmente, sin embargo ha sido descrito en gente joven quienes se abstienen de actividades sociales y

muestran poco interés escolar, por el trabajo u otras actividades(27).

4.2.3 METABOLISMO Y FARMACOCINÉTICA

El delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), el principal constituyente psicoactivo de la marihuana es rapidamente transferido de los pulmones a la sangre durante el fumado de la hierba. El metabolismo oxidativo del THC produce un metabolito activo el 11-hidroxi-delta-9-tetrahidrocannabinol (11-OH-THC) y el metabolito inactivo 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahidrocannabinol(THC-COOH). La caracterización de la fase de absorción de los cannabinoles es importante porque rapidamente penetra el THC en el sistema nervioso central produciendo sus efectos psicoactivos, siendo los niveles del 11-OH-THC sustancialmente más bajos que los del THC. Por otra parte la formación de metabolitos de THC se debe a la hidroxilación microsomial del THC que produce el 11-OH-THC y la oxidación de este produce el metabolito inactivo (THC-COOH) que se incrementa gradualmente y exceden los niveles del THC después de fumar el cannabis. El curso de tiempo de detección del THC-COOH es mucho más largo que el del analito activo. Este tiempo extendido de detección de estos metabolitos se debe a la lenta liberación y subsecuente metabolismo del THC de los tejidos almacenadores.

El mayor metabolito del delta-9-tetrahidrocannabinol encontrado en orina es el 11-nor-delta-9-tetrahidrocannabinol

(THC-COOH), el cual persiste en ambas formas libre y conjugada con ácido glucurónico. Se considera que la presencia de concentraciones iguales o mayores de 15 ng/mL, determinadas en análisis de espectrometría de masa en muestras de orina indican positividad de uso de marihuana(21).

La marihuana y otros productos del cannabis son usados ya sea fumado o ingerido, produciendo disturbios comportamentales, perceptivos, afectivos y cognitivos en los usuarios. El constituyente del cannabis, responsable por la mayoría de esta respuesta psicoactiva es el delta-9-tetrahidrocannabinol o THC cuya respuesta psicoactiva interfiere con efectos desfavorables para realizar actividades complejas de destrezas de coordinación motora(28).

La vía metabólica del THC es mostrada en(figura 5), esta rápida transformación de los cannabinoides en una variedad de metabolitos ocurre a nivel hepático y concretamente por la participación en esta degradación del citocromo P450(figura 6) que produce en primer término la formación de derivados monohidroxilados que por su vez son metabolizados en derivados polihidroxilados y sucesivamente en cetonas, aldehidos y ácidos carboxílicos, entre los cuales el principal metabolito determinado en plasma y orina es el 11-nor-THC-9-carboxílico (21).

El sistema monooxigenasa citocromo P450 es una familia de enzimas, siendo el mayor catalizador de reacción de biotransformación de drogas. Es considerada una superfamilia de enzimas catalizadoras con una amplia variedad de reacciones

oxidativas y reductivas, que poseen actividad para un grupo diverso de sustratos químicos.

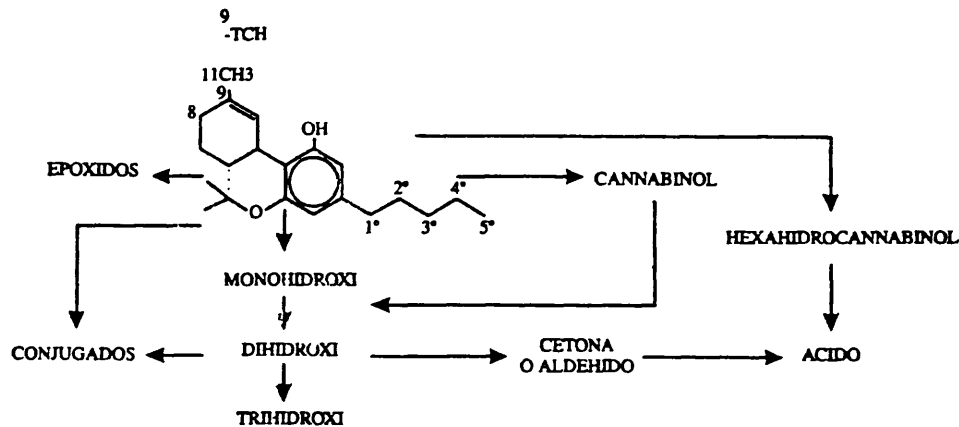


Figura 5. Vía Metabólica de los Cannabinoides. Tomado de Monografía de Drogas de Abuso, ABBOTT(21).

Las enzimas citocromo P450 son proteínas que contienen en sus membranas "heme", localizadas en el retículo endoplasmático liso (REL) de numerosos tejidos. Estas hemoproteínas están en asociación muy próxima con una segunda proteína de membrana, la NADPH-citocromo P450 reductasa en una relación de cerca de 10 moléculas de citocromo P450 por una de reductasa. La interacción entre el citocromo P450 y proteínas reductasa es facilitada por la doble capa de lípidos en la cual ellas están colocadas. Las reacciones oxidativas catalizadas por el sistema microsomial monooxigenasa requiere para su funcionamiento la citocromo P450 hemoproteína, NADPH-citocromo P450 reductasa, NADPH y oxígeno molecular.

Las reacciones de sustratos xenobióticos con la forma oxidada(Fe^{3+}) del citocromo P450 forma un complejo enzima sustrato. El citocromo P450 reductasa acepta un electrón del NADPH el cual reduce el complejo citocromo P450-xenobiótico oxidado. El complejo reducido citocromo P450-sustrato(Fe^{2+}) reacciona con oxígeno molecular y un segundo electrón de NADPH es donado a través de la reductasa flavoproteína para formar una especie de oxígeno activado. En el paso final un átomo de oxígeno es liberado como H_2O y el segundo átomo de oxígeno es transferido al sustrato. Sobre liberado el sustrato oxidado, la enzima citocromo P450 oxidado es regenerado. Las biotransformaciones oxidativas catalizadas por citocromo P450 monooxigenasas incluyen cadenas aromáticas y hidroxilación, dealquilación, deaminación, dehalogenación y desulfuración. Un número de reacciones reductivas también son catalizadas por las enzimas citocromo P450 generalmente debajo de condiciones de escasa tensión de oxígeno. La característica común estructural de los diversos grupos de xenobióticos oxidados por las enzimas citocromo P450 es su elevada liposolubilidad (tabla 1)(27).

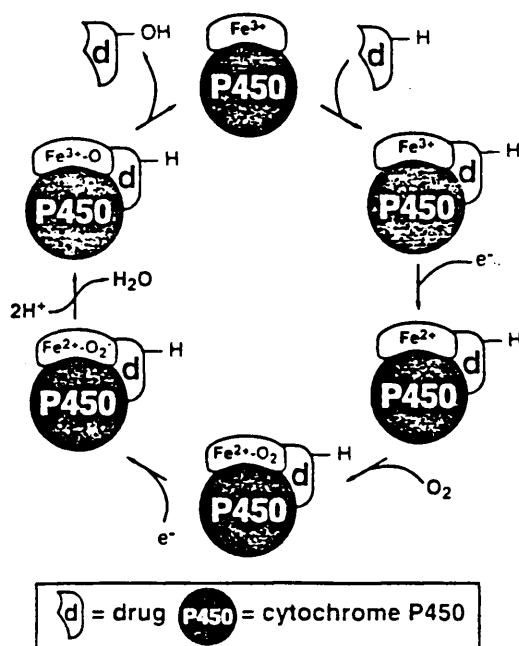


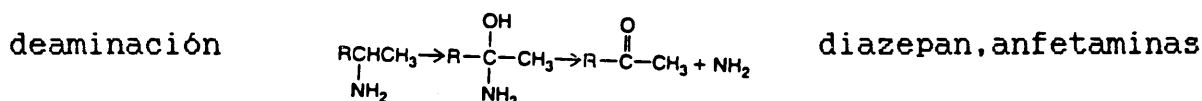
Figura 6. Mecanismo de oxidación de drogas por Citocromo P450. Tomado de Goodman e Gilman's (27).

La biotransformación de las drogas responde a las características lipofílicas de las drogas que promueven su paso a través de las membranas biológicas y subsecuentemente acceden a los sitios de acción con la finalidad de impedir su eliminación del cuerpo. La excreción renal de las formas inalteradas juega solo un papel modesto en todo el proceso de eliminación. Los compuestos lipofílicos filtrados a través de glomérulos son ampliamente reabsorbidos a través de las membranas tubulares. La biotransformación de las drogas y otros xenobióticos en metabolitos más hidrofílicos es por lo tanto esencial para la terminación de su actividad biológica y la eliminación de estos compuestos del cuerpo. En general las reacciones de biotransformación generan más metabolitos inactivos polares que son rápidamente excretados del cuerpo.

No obstante en algunos casos son generados metabolitos con actividad biológica potente o propiedades tóxicas.

Las reacciones de biotransformación de droga son clasificadas en dos fases I y II. Las reacciones fase I de biotransformación generalmente resultan en la pérdida de actividad farmacológica, si bien existen casos en donde ocurre aumento de actividad. Raramente el metabolismo ha sido asociado con una actividad farmacológica alterada. Los productos metabólicos de la fase I surgen fundamentalmente por hidrólisis o ligaciones con esteres, siendo excretados en orina o entonces reaccionando con compuestos endógenos para formar conjugados solubles en agua. (tabla 3)

Reacciones oxidativas	Reacción	Ejemplos
N-dealquilación	$\text{RNHCH}_3 \text{ ----> RNH}_2 + \text{CH}_2\text{O}$	codeina, morfina
O-dealquilación	$\text{ROCH}_3 \text{ ----> ROH} + \text{CH}_2\text{O}$	codeina



Reacciones conjugación

glucuronidación	morfina, diazepan THC
-----------------	--------------------------

Tabla 3. Reacciones de biotransformación de drogas de abuso.

Modificado de BENET, Z.L. e cols. (27).

Las reacciones fase II consisten en reacciones de conjugación con ventaja de formar unión covalente entre grupos funcionales de compuestos parientes con ácido glucurónico, sulfato, aminoácidos o acetato. Estos conjugados de elevada polaridad son generalmente inactivos y son excretados rápidamente en orina y heces como es el caso de la eliminación del THC(27).

El delta-9-THC al sufrir biotransformación por la acción de citocromo P450 en hígado produce los derivados 11-hidroxi-delta-9-THC y este el delta-8-THC a partir del cual se origina el 11-hidroxi-delta-8-THC. Estos originan otros metabolitos más polares y de menor actividad como el ácido 11-nor-delta-9-THC carboxílico, siendo este el metabolito más abundante en plasma y orina con capacidad de conjugarse con ácido glucurónico para su eliminación en orina(18).

Una característica farmacocinética de los cannabinoides es su elevada solubilidad en lípidos y baja en agua, este factor juega un papel muy importante en la metabolización de esta droga y en la persistencia de sus efectos psicoactivos explicando en gran medida la elevada vida media de esta sustancia debido a su retención en lípidos corpóreos.

Al ser la vía de administración fumada la más frecuente de consumo del cannabis, los efectos de la droga van depender de la velocidad del fumado, del volumen inhalado, así como del tiempo de retención del humo inspirado en los pulmones. Se estima que cerca del 20% de delta-9-THC este contenido en el

humos inhalados del cannabis. Por otra parte el consumo oral menos habitual transforma el delta-9-THC en 11-hidroxi-delta-9-THC por la acción de los ácidos gástricos causando efectos similares a los producidos en la modalidad fumada siendo no obstante de mayor intensidad y duración.

Se estima que el mecanismo de acción sea por depresión global del sistema nervioso central. Otra posibilidad es que actúen sobre los receptores benzodiazepínicos o inclusive por un mecanismo de receptores específicos(25).

En virtud de la elevada afinidad lipofílica del THC es lento su retorno al plasma observándose una presencia de concentraciones de THC mensurables en plasma y orina muchas horas y hasta varios días después de la última administración de la droga a través de métodos inmunoquímicos cuya sensibilidad del test dependerá evidentemente del punto de corte que consideremos(21). En nuestro estudio hemos empleado cut off de 25 ng/mL para el método FPIA, de 50 ng/mL para el Cedia y de 50 ng/mL para el KIM.

La vida media de eliminación del delta-9-THC es de aproximadamente 30 hs, siendo la tasa de excreción del 70% de la dosis inicial en la primera semana y de aproximadamente un 65% de la dosis eliminada por vía fecal(18).

4.2.4.- METODOS DE DETECCION

La detección de metabolitos de marihuana así como de otras drogas de abuso en fluidos biológicos se ha extendido notablemente por inmunoensayos(29). Sin embargo existen dificultades en su detección debido a su elevada liposolubilidad y consecuentemente baja concentración en fluidos orgánicos. Además puede ocurrir problemas con la estabilidad de esta sustancia en muestras de orina que puede reducir sensiblemente las concentraciones del THC y sus metabolitos en el transcurso del tiempo, que por su vez está intrínsecamente relacionado con la temperatura de conservación de la muestra, de la cantidad de muestra de orina y del tipo de recipiente que acondiciona la muestra para que ocurra oxidación del carboxi-THC(21).

Fundamentalmente los análisis de laboratorio que permiten detectar la presencia de cannabinoides en fluidos biológicos, tienen por objetivo confirmar en primer lugar el consumo de marihuana(25). En una fase preliminar de estudio de drogas de abuso en fluidos biológicos se aplican técnicas de rastreo por inmunoensayo, en este estudio fueron utilizadas la fluorescencia polarizada(FPIA), el inmunoanálisis por interacción cinética de partículas(KIM) y el Cedia, cuyos principios de acción están explicados en los apartados correspondientes en material y métodos.

En relación a métodos confirmatorios fueron usados la cromatografía de gases-espectrometría de masas por ser

entre los existentes en la actualidad el método de confirmación más fiable(21).

4.2.5.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La interpretación de resultados por inmunoensayos se presta a controversias, principalmente con relación a la precisión de los métodos, puntos de corte, selectividad y confiabilidad de resultados. Actualmente es una técnica estimada y preferida en estas determinaciones de metabolitos de drogas de abuso en primer lugar por la facilidad que representa la automatización del proceso y en segundo lugar por su elevado rendimiento de trabajo(29). Es imprescindible que estos resultados se interpreten en función del historial clínico del paciente y se considere la farmacocinética y el metabolismo de la propia droga de abuso(18).

4.3 CONSIDERACIONES ACTUALES SOBRE EL METABOLISMO DE LA COCAINA

4.3.1. Introducción

La cocaína es un estimulante del sistema nervioso central(SNC), pero también actúa como simpaticomimético y anestésico local(30), incrementando la presión sanguínea, la tasa cardíaca y la temperatura corporal. Dosis de 25 mg producen euforia dentro de 2 minutos por administración intravenosa o entre 3-5 minutos cuando tomada intranasalmente. Una serie de manifestaciones pueden seguirse entre 20 y 60 minutos después de la administración de cocaína entre ellas un shock o estrépita sensación de ansiedad, depresión, fatiga y el deseo por más cocaína, resultando en una acción fuertemente reforzadora en el adicto que culminará en repetidas dosis, pudiendo alcanzar el consumo entre 1 a 4 gr de cocaína y estados de hebridad cocaínica que podrán durar entre 1 y 24 hs(10,31).

La cocaína es el principal alcaloide extraída como pasta cruda de las hojas de la *Erythroxylon coca*(21,32). La pasta de cocaína es derivada de las hojas secas de coca, disueltas en una solución de querosene o gasolina, bases alcalinas, permanganato de potasio y ácido sulfúrico. La pasta de cocaína contiene cocaína, sulfato, otros alcaloides de coca disolventes y adulterantes. La sal formada de clorhidrato de

cocaina es preparada de la pasta de coca mezclada con ácido clorhídrico y es soluble en agua(30,33). La pasta de coca recibe su nombre vulgar de nieve, coca, etc. Es práctica frecuente convertir hidrocloreto de cocaina a la base libre antes de su comercialización ilegal. La hoja de cocaina contiene numerosos alcaloides de los cuales el más ampliamente conocido es la cocaina.(Figura 7)

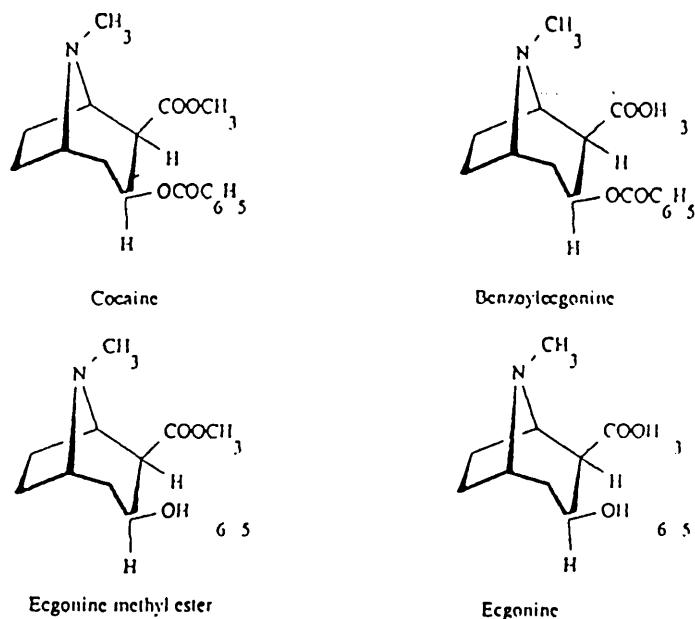


Figura 7. Estructuras de la cocaina y metabolitos. Tomado de COLE,M.D.(1)

La cocaina como base libre pueden ser extraidas de las hojas de la planta en la forma de aceite viscoso. El clorhidrato de cocaina o hidrocloreto de cocaina liberada de los iones ClH o sal, deja la cocaina alcaloide libre que puede ser ailada por precipitación con ácido clorhídrico de una solución orgánica de la base libre. La sal hidrocloreto de

cocaina tiene aspecto de polvo blanco conocido como nieve, cuando en solución acuosa es precipitado con bicarbonato sódico constituyendo el conocido crack(1,30). El crack es 25 a 100% base libre de cocaina pura y no requiere otro procesamiento químico como el hidrocloreto de cocaina, siendo el crack de inmediato y completamente absorbido cuando fumado con pipa de agua. Su bajo costo ha incrementado su disponibilidad en el mundo particularmente en usuarios adolescentes(33). El clorhidrato de cocaina se descompone con el calor y además no puede ser fumado comparado con la base libre, la cual es dos veces más volátil. Es también de mayor liposolubilidad y como resultado absorbida por vía pulmonar muy rápidamente.

El consumo de cocaina se ha incrementado particularmente por la variedad y versatilidad en el modo de vías de administración. La cocaina snifada a partir del derivado de la sal de cocaina, o bien fumada del derivado de la base son formas de administración que eliminan la necesidad de administración endovenosa, esto hace que los efectos producidos sean casi instantáneos análogos a la inyección intravenosa y es por esto probablemente que la práctica del abuso de la cocaina de esta forma cuenta con una rápida extensión de la adicción, asociado a la reducción de la contaminación de enfermedades parenterales como la hepatitis C y el contagio del SIDA en el intercambio y manipulación de jeringuillas(30,34,18).

El abuso de cocaina ha alcanzado elevadas proporciones

en U.S.A superando a la heroína, compitiendo con las anfetaminas. siendo actualmente las drogas estimulantes de abuso favoritas, constituyendose el mayor problema de droga. Hasta muy recientemente la cocaína usada en Europa fue confinada a elevadas élites por los elevados precios, siendo en la actualidad el principal blanco para la importación ilegal(30).

4.3.2 FARMACOLOGIA

El alcaloide cocaína deriva del ácido benzoico éster benzoico del aminoalcohol ecgonina. Posee la estructura química de una base azoada, similar a la atropina con efectos farmacológicos antagónicos(21).

La cocaína es directamente tóxica para el cuerpo y poderosamente tóxica al cerebro, estando las complicaciones del uso de la cocaína en función de la ruta de administración(35). Los efectos fisiológicos dependen del modo de distribución de la droga en los órganos diana, de entre los cuales el cerebro es el órgano más afectado por la cocaína, siendo decorrentes los efectos fisiológicos directamente de la interacción química entre la cocaína y receptores cerebrales(33). La acción de la cocaína sobre la neurotransmisión dopaminérgica es lo que condiciona la conducta reforzadora de su uso. Las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral tienen la función de mediar las propiedades reforzadoras de las drogas de abuso.

Seguida a una administración de cocaína por vía parenteral ocurre inhibición de la recaptación de catecolaminas y de serotonina(36), debido a un cambio conformacional del receptor para dopamina en presencia de la cocaína, disminuyendo así la afinidad por dopamina y en consecuencia reduciéndose con esto su recaptación. El incremento de dopamina en el espacio intersináptico y la acción sostenida de la dopamina desencadena los eventos neuroquímicos(22), que ocurren en esta interacción causando disturbios mentales y de comportamiento.

La base química del ciclo euforizante y del deseo de la cocaína es denominada "Teoría de la reducción de la dopamina". Al formarse circuitos neuronales en el cerebro a través de la intercomunicación y uniones sinápticas de millones de células nerviosas, la participación de neurotransmisores como la epinefrina, norepinefrina y dopamina afectan el centro cerebral del placer, siendo responsables por el elevado estado de ánimo.

La cocaína actuaría evitando el acoplamiento de la dopamina en los receptores dopaminérgicos presinápticos, impidiendo su metabolización y degradación por la monoaminoxidasa(MAO) en el terminal presináptico, siendo de esta forma la dopamina responsable por permanecer estimulando el receptor post-sináptico de las neuronas receptoras ubicadas en el centro cerebral del placer o sistema de recompensa mesolímbico, ocurriendo una hipersensibilización de las células receptoras a la dopamina en un esfuerzo de compensación de su déficit cuando la dopamina desaparece de la sinapsis. Esta in-

terferencia de la cocaína en el equilibrio neurotransmisor es responsable por el síndrome de abstinencia que puede traducirse como el intento del cuerpo para recuperar este equilibrio, siendo producto de la reducción neurotransmisora(30).

Se relaciona también a la cocaína con otros efectos periféricos agudos descargados en el sistema nervioso simpático como lo son estimulación simpática mediada por neurotransmisores norepinefrina y epinefrina en órganos como el corazón causando taquicardia, hipertensión. A nivel tegumental la estimulación simpática determinará sudoresis profusa, por otra parte causará hiperpirexia y retenciones urinaria e intestinal además de los efectos cerebrales característicos que causa como alucinaciones sensoriales, temblores, irritabilidad, confusión mental y convulsiones epileptiformes. Estos disturbios psíquicos con alteraciones de la percepción subjetiva se manifiestan más a menudo en el consumidor crónico, que podrá acompañarse de rinitis crónica y de perforaciones del tabique nasal. Debido al efecto anorexígeno el cocainómano sufre de malnutrición que condiciona a una inmunodeficiencia y por lo tanto es más susceptible al riesgo de infecciones(21). En elevadas dosis de cocaína así como en el abuso crónico los efectos en el SNC conllevan a la amnesia, delirio, estupor y coma. Estados de intoxicación crónica pueden conllevar a convulsiones sostenidas que detienen la respiración e inducen a arritmias cardíacas fatales, como taquiarritmias atrial y ventricular, las cuales son más probables de llevar al éxito

letal si existe predisposición a problemas cardiacos. La presión arterial puede elevarse severamente y producir súbito accidente vascular cerebral dependiendo de la susceptibilidad del individuo(33,36,22).

4.3.3 METABOLISMO Y FARMACOCINÉTICA

El metabolismo de la cocaina ocurre por dos procesos principales, siendo uno de los cuales enzimático. El proceso de hidrólisis enzimático relaciona las colinesterasas plasmáticas y hepáticas y es cuantitativamente el más importante. El metabolito producido por esta hidrólisis enzimática es la ecgonina metil ester (EME). El otro proceso de metabolización no enzimático o químico conduce a la producción de benzoylecgonina(BZE)(37)(Figura 8).

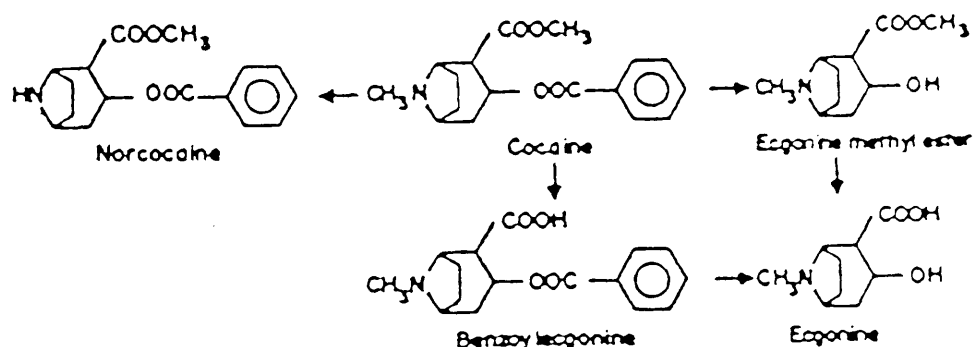


Figura 8. Metabolismo de la cocaina. Tomado de Braithwaite et al.(10)

La cocaína es hidrolisada espontáneamente en orina, plasma y sangre a sus metabolitos. La benzoylecgonina resultante de la metabolización de la cocaína constituye 40% de la dosis administrada y puede ser detectada con precisión por técnica de inmunoensayo superior a 2 días después de su administración. La cocaína en forma inalterada se excreta en 1% del total de la dosis suministrada y puede ser detectado por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) en tan solo 24 hs(38). Entre 12 y 21% de la dosis de cocaína es metabolizada a EME(39). Cerca del 80% de la dosis inicial de cocaína es excretada en la forma de estos metabolitos benzoylecgonina (BZE) y ecgonina metil ester (EME). La vida media plasmática de la cocaína, BZE y EME son respectivamente 30 a 90 minutos, 7.5 hs y 4 hs. Si bien el hallazgo de la cocaína y sus metabolitos en fluidos biológicos no demuestra acción psicótica, su presencia en estos a menudo suele relacionarse a solo una exposición previa de intoxicación por cocaína. Debe por tanto a este propósito utilizarse técnicas de investigación toxicológica con la finalidad de cuantificar la droga en fluidos biológicos para correlacionarla con la duración de los efectos farmacocinéticos en los estudios de los casos. En análisis forenses para la determinación de cocaína y sus metabolitos en muestras biológicas se utilizan y se recomiendan la técnica cromatográfica a gas acoplada a la detección por espectrometría de masas. Otros detectores más sencillos que pueden utilizarse son el detector nitrógeno-fósforo y ionización de llama. Ambas técnicas requieren deriva-

tización de las moléculas, la cual se puede aplicar en técnicas automatizadas(1).

En virtud de las susceptibilidades individuales, la vida media de eliminación de cocaína en plasma es cerca de 50 minutos, con un rango de 16-90 minutos. Por vía intranasal tiene un tiempo medio de 75 minutos, por vía intravenosa es de 54 minutos, y por vía oral es de un promedio de 48 minutos. Solo entre 1-9% de la cocaína aparece inalterada en orina, y esto es usualmente detectable solo en pocas horas. La excreción de la cocaína depende del pH urinario, la exposición a cocaína se observa mejor analizando metabolitos urinarios(figura 7), por otra parte parece ser que la cocaína aparece estable en cabello(10).

La mayor ruta de metabolismo de la cocaína envuelve la hidrólisis de cada uno de sus dos grupos ésteres. La benzoylecgonina producida sobre pérdida del grupo metil representa el mayor metabolito y puede ser encontrado en orina entre 2-5 días después de la administración de la última dosis siendo en los consumidores excesivos la posibilidad de encontrarse este metabolito hasta 10 días seguido su último consumo(22).

Segun la forma de administración de la cocaína tendremos distintas características farmacocinéticas(21), siendo su biodisponibilidad y consecuentemente de sus efectos en función de varios factores como la pureza de la cocaína, modalidad de administración, frecuencia de administración, si esta es combinada con otras drogas de abuso (efecto sinérgico), de la

condición física y mental del individuo consumidor y por último del entorno social del usuario de cocaína que juega un papel importante(30).

La cocaína bloquea los receptores de transporte de dopamina incrementando la estimulación dopaminérgica en sitios críticos cerebrales, además bloquea la recaptación de norepinefrina y serotonina por los receptores específicos de estos neurotransmisores, produciendo el uso continuado y crónico de cocaína cambios en estos sistemas de neurotransmisión cerebral, causando interferencia en el metabolismo de estos neurotransmisores como es la reducción en la formación del metabolito de la serotonina 5-hidroxitriptófano(5-HIAA)(27).

La metabolización de cocaína a sus principales metabolitos BZE y EME es de 29-54% y 26-60% formadas respectivamente por la hidrólisis química y por la participación de esterases plasmáticas y hepáticas. Las enzimas plasmáticas tienen elevada afinidad por la cocaína, por lo tanto la formación de los dos metabolitos es similar, salvo en usuarios con deficiencia de colinesterasas(10). Todavía once metabolitos de cocaína pueden ser identificados en orina incluyendo ecgonina, ecgonidina y norcocaína, pudiendo también formarse metabolitos derivados de la conjugación con el alcohol etílico. El único metabolito potencialmente activo es norcocaína encontrado en pequeñas concentraciones (figura 8) entre 3-87 ug/L en orina, permaneciendo más de 4 horas después de una dosis intravenosa

de 100 mg de cocaina. Sin embargo la ingestión simultanea de alcohol conlleva a transesterificación de la cocaina a etil-benzoylecgonina(coca-etileno), la cual potencia las acciones y efectos en el SNC y tiene un largo tiempo de eliminación. La detección de la presencia de coca-etileno en cabello puede confirmar indirectamente ingestión de cocaina. El cocaetileno es toxicologicamente importante porque simultaneamente al usarse cocaina con etanol se prolonga la acción de la cocaina y consecuentemente sus efectos hepatotóxicos.

4.3.4.- MÉTODOS DE DETECCIÓN

La cocaina es termolábil, tendiendo a perder ácido benzoico para formar metil-ecgonidina. La hidrólisis de la cocaina ocurre a pH 5.5 y su vida media en solución acuosa disminuye progresivamente. La cocaina es más estable en solución acuosa a pH 3-4, siendo estable a $\text{pH} < 4$ por más de 24 días a 24°C , mientras la base es estable indefinidamente si almacenada en metanol a -15°C . Sin embargo dejando BZE en metanol puede originarse su metabolito metilester. La BZE es más estable a pH 1.8 y en orina a pH 5-9 a 4°C puede ser estable por 200 días. Muestras almacenadas a pH 9 pierden más de 50% entre 20-30 días, especialmente si almacenada a temperatura ambiente.

4.3.5.- Preparación de la muestra

La cocaina es facilmente extraida de fluidos biológicos

a pH neutro con cloroformo y a $\text{pH} > 8$ por la mayoría de disolventes. Condiciones excesivamente alcalinas $\text{pH} > 9$ deben evitarse para prevenir la hidrólisis de la cocaina. Es debilmente extraída por disolventes lipofílicos. Las mezclas de disolventes incluidos alcoholes de cadena corta por ejemplo el diclorometano o cloroformo + etanol o propanol han provado ser los más eficientes, cloroformo/propanol(9:1), cloroformo/etanol(4:1) o diclorometano/propanol(3:1). Se han desarrollado técnicas en fase sólida para extracción de cocaina y sus metabolitos por métodos con cartucho certify, que han sido utilizados en la presente investigación.

Los métodos cromatográficos a gas para detección de cocaina y sus metabolitos en orina requieren de un proceso previo de derivatización de sus grupos carboxilo para mejorar su cromatografía, esto confiere estabilidad y volatilidad a las moléculas y protección de sus grupos polares. Se utilizan para derivatizar formas de metil ester, propil, isopropil, butil, ciclohexyl, silil, y pentafluoropropil esterés

4.3.6.- Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

La elevada solubilidad de la BZE ha hecho del HPLC un buen método para su detección, sin necesidad de derivatizar. Buenos límites de detección pueden ser alcanzados menores de 20 $\mu\text{g/L}$, siendo la preparación de la muestra simple. Sin embargo puede ocurrir pérdida de ácido benzoico y formación de ecgonina metil ester y ecgonina, siendo que estos componentes

tienen baja absorción ultravioleta (UV). Se han utilizado detectores electroquímicos con éxito para la determinación de estos metabolitos predominantemente con columnas C18 fase reversa. Las fases móviles son generalmente el metanol y el acetonitrilo/ácido buffer (pH 2-3) a menudo combinado con una amina modificada, cloruro de sodio o un par iónico.

4.3.7.- MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

En relación a los métodos inmunológicos la mayoría de los inmunoensayos son designados para detectar BZE y son relativamente específicos. Niveles urinarios de BZE después de dosis intravenosas de 1.5 mg/Kg de clorhidrato de cocaína exceden 10 mg/L sobre las primeras 24 horas. Después de una dosis de 20 mg de clorhidrato de cocaína en hombre adultos, la BZE es detectable en orina por EMIT a partir de un umbral de 300 ug/L superior a 40 horas. Después de una dosis de clorhidrato de cocaína de 1.5 mg/Kg tomado nasalmente, un método más sensible el RIA tiene una sensibilidad 25 ug/L, detectando BZE en orina entre 72-144 horas, refiriendo resultados positivos superiores a 10 días por este método después de uso de elevadas dosis de cocaína.

La valoración de las diferentes técnicas de inmunoensayos, Abbott ADX, Roche Abuscreen, EMIT, tienen una muy buena sensibilidad cuanto a evaluación cuantitativa se refiere en relación a la técnica confirmativa GC-MS.

La incidencia de cocaína entre muestras de drogodependientes es del orden de 2-15%.

Para determinar que una muestra biológica es negativa debe ser usado un inmunoensayo, debido a que la cromatografía capa fina no es suficientemente sensible(10).

4.3.8.- TIEMPO DE DETECCIÓN

El tiempo para el cual la cocaína y sus metabolitos son detectables en orina después de su administración es regido por algunos factores. Estos incluyen el tamaño de la dosis, el modo de administración, volumen urinario y pH, el metabolismo individual y el límite de detección del test del procedimiento utilizado. La cocaína puede ser detectado de 2-4 hs después de una administración de una dosis de 1.5 mg de clorhidrato de cocaína/Kg peso por cromatografía en capa fina con una detección límite de 500 ug/L. Análisis de cabello permite monitorizar exposición a cocaína durante meses.

Para la determinación de cocaína y benzoylecgonina(BZE) en casos forenses los métodos analíticos deben tener una elevada especificidad. La técnica por excelencia para detección de cocaína y BZE en fluidos biológicos es GC-MS, pudiendo también emplearse otros detectores no con la misma especificidad que el masas pero de significativa resolución como son el GC/NPD y GC/FID (40).El GC-MS con el sistema de monitorización iónica(SIM) es el preferido para determinación de cocaína y sus metabolitos en sangre postmortem(40.19).En la interpretación de la toxicología postmortem los patólogos y toxicólogos hacen incapie acerca de la relación entre las concentraciones de analitos de drogas medidas en

muestras de autopsias y las concentraciones existentes en el momento de la muerte debido a que muchas drogas son secuestradas en los tejidos en vida por la propiedad lipofílica que poseen y son liberados en sangre en el intervalo postmortem. Esto puede causar elevación drástica de concentraciones de droga en sangre postmortem procedentes de algunos sitios viscerales(41).

4.4. CONSIDERACIONES ACTUALES SOBRE EL METABOLISMO DE LAS ANFETAMINAS

4.4.1.- INTRODUCCIÓN

La anfetamina y metanfetamina son poderosos estimulantes del sistema nervioso central (SNC), relacionados químicamente y farmacológicamente con las catecolaminas, epinefrina y norepinefrina(42), las cuales tienen también acciones sobre el sistema nervioso periférico. Fue utilizado hace algunos años como anorexígeno para el tratamiento de la obesidad(1). Su pronunciado abuso potencial ha resultado en una drástica reducción en su uso médico. Dosis orales de 10-30 mg produce elevación del humor, incrementa confianza en si mismo y la alerta con mejora de la forma física. El abuso crónico conduce al desarrollo de la tolerancia tal que algunos adictos consumen o se inyectan 2000 mg diarios. Esto a menudo conduce a alucinaciones y psicosis bien como disforia y depresión en la abstinencia(10). Las anfetaminas producen estado de alerta, de vigilia, incrementa la energía y la confianza en si mismo, reduce el hambre y aumenta la sensación de bienestar, induce a psicosis con euforia y alucinaciones, pudiendo en determinadas circunstancias de severa toxicidad conducir a la muerte. la dosis letal suele estar alrededor de 20-25 mg/Kg de peso corporal(21). Las anfetaminas más comunes son la d-anfetamina, d-metanfetamina y d,l-anfetamina. Su indicación y utilización en clínica está limitada al tratamiento de la

narcolepsia y desordenes del deficit de atención. La inducción a la tolerancia y dependencia psicológica en relación con el consumo de elevadas dosis la destaca para su abuso. La d-anfetamina es cuatro veces más potente estimulante del SNC que la d,l-anfetamina, teniendo mucho mayor potencial para el abuso. Las anfetaminas pueden tomarse oralmente, intravenosa-mente, fumarse o inhalarse por via nasal(43).

Son sustancias psicoestimulantes sintetizadas en laboratorio denominadas drogas de diseño, muy utilizadas como droga de diversión de grupos juvenes, sus principales efectos son estimular el estado de alerta o vigilia y la euforia además de producir rapidamente tolerancia. El consumo progresivo y continuado puede evolucionar a un estado psicótico tóxico con alucinaciones auditivas y visuales, pudiendo producirse éxito letal por depresión del centro respiratorio bulbar(1,22).

4.4.2.- METABOLISMO Y FARMACOCINÉTICA

Anfetamina y metanfetamina son derivados de feniletilamina(1)(figura 9), otros congéneris tales como mefentermina, fentermina y dietipropion también tienen similares propiedades anoréxicas y estimulantes , y son ocasionalmente abusadas. Muchos otros complementos dietéticos y medicamentos antialérgicos contienen efedrina, pseudoefedrina o fenilpropanolamina. Anfetamina y metilanfetamina son

facilmente sintetizados por laboratorios ilícitos y la base libre o preparaciones fumables de metilamfetamina son conocidas como cristal o gelo.

La MDMA(3,4-metilendioximetilamfetamina) o éstasis(fig.9) es un derivado de anfetamina ilícita usualmente tomada en dosis de 100-200 mg, la cual tiene actividad alucinógena. La MDA(3,4-metilendioxietilamfetamina) tiene propiedades similares. La MDMA es usada casi exclusivamente como droga de recreación, particularmente difundida en fiestas populares donde la música pesada y rápida requiere componente de esfuerzo físico, combinado con los efectos farmacológicos potenciados por la droga, causando paralelamente una exacerbación hipertérmica corporal denominada hipertermia maligna acompañada de un cuadro de severa deshidratación debido a carencia de fluidos corporales. Pueden ocurrir reacciones severas como convulsiones, rabdomiólisis y insuficiencia renal aguda, incluso hasta la muerte en personas más susceptibles después del uso de MDMA(10).

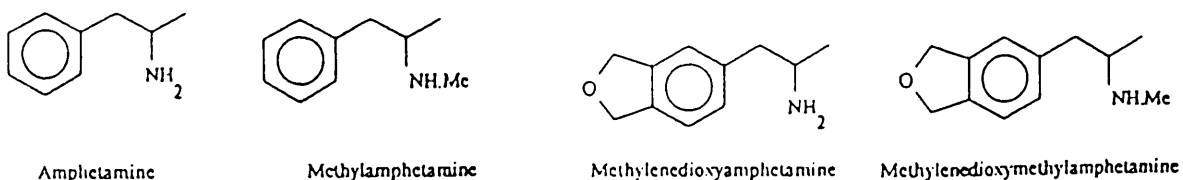


Figura 9. Estructuras de anfetamina y derivados. Tomado de COLE,D.M.(1).

La vía de administración de la anfetamina es preferiblemente oral, esta y la metilanfetamina son rápidamente absorbidas en el intestino delgado completándose su absorción entre 4 y 6 hs, por su elevada lipofilidad atraviesan rápidamente la barrera hematoencefálica(22,18). Poseen una limitada unión a proteínas plasmáticas, por lo que se encuentran en muy bajas concentraciones plasmática del orden del 16%, con elevado volumen de distribución(21), aparecen en orina después de 20 minutos de su ingestión. Una pequeña porción de la dosis de metilanfetamina es demetilada a anfetamina y otra es convertida a p-hidroximetilanfetamina(figura 10).

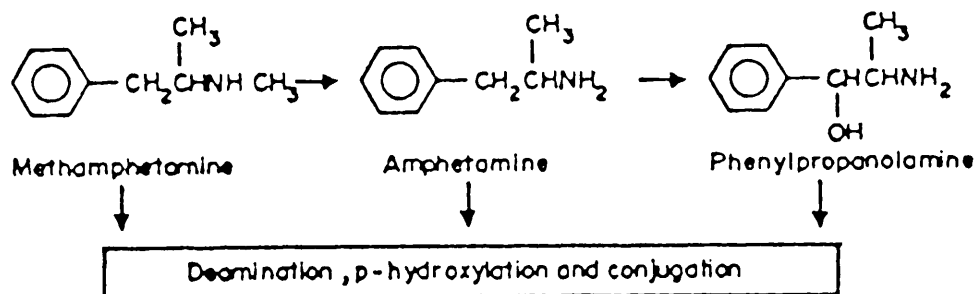


Figura 10. Metabolismo de la Anfetamina. Tomado de Braithwaite et al.(10).

La anfetamina es deaminada a fenil acetona, la cual es oxidada a ácido benzoico(figura 11), una pequeña porción de anfetamina es convertida a fenilpropanolamina.

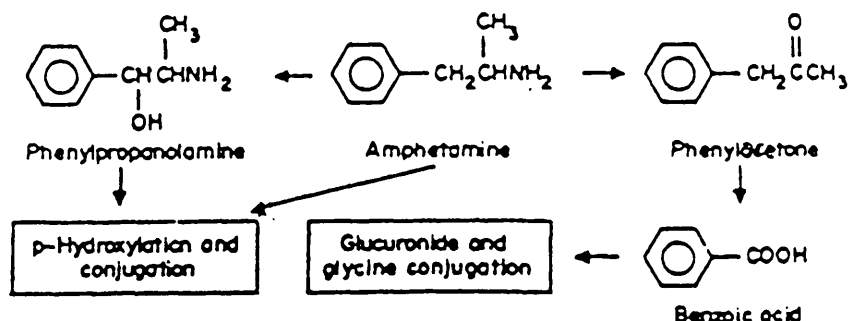


Figura 11. Metabolismo de la Anfetamina. Tomado de Braithwaite et al.(10).

El pH de la orina tiene un profundo efecto sobre la excreción urinaria de ambos compuestos. En pH normal de la orina, acima del 43% de la dosis de metilamfetamina es eliminado inalterada en 24 hs en orina con 4-7% como anfetamina. Disminuyendo el pH de la orina alrededor de 5.0 incrementa estos valores a 76% y 7% respectivamente. En pH alcalino solo 2% de la dosis es metabolizada después de 24 hs como metilamfetamina y menos del 0.1% como anfetamina(10).

El metabolismo de las anfetaminas ocurre en el hígado de dos formas, por deaminación o por hidroxilación del anillo aromático de un lado de su cadena. Siendo la deaminación la mayor vía metabólica en seres humanos con el producto final el ácido hipúrico que es conjugado con la glicina para su posterior excreción. La anfetamina es también excretada en la orina de forma inalterada, mientras la metanfetamina es parcialmente metabolizada a anfetamina. Las anfetaminas

aparecen en orina dentro de tres horas después de cualquier forma de administración y pueden ser detectadas por técnicas de inmunoensayo de 24 a 48 hs después de la última dosis(5).

Cerca del 30% de la dosis ingerida es excretada en 24 hs en orina bajo condiciones de pH urinario normal, pero en pH ácidos aproximado a 5.0. cerca del 74% es eliminado en este mismo período. este proceso es pH urinario dependiente debido que en orina alcalina la anfetamina se presenta en su forma no ionizada. siendo reabsorbida en tubulos renales. ya en orina ácida ocurre lo inverso. en cuyo caso la excreción es más abundante y rápida(21). Por otra parte en orina con pH alcalino se puede reducir su excreción a 1%. lo cual ha sido explotado por los abusadores de drogas. quienes toman amplias cantidades de bicarbonato sódico para prolongar los efectos farmacológicos de las anfetaminas y al mismo tiempo reducir las cantidades disponibles para su detección en la orina(10).

La vida media plasmática de las anfetaminas se altera en función de la velocidad de excreción urinaria. disminuyendo cuando el pH urinario es ácido eliminandose cerca del 50% a 80% de la dosis administrada. y por el contrario persisten los niveles plasmáticos elevados cuando la orina es alcalina(18).

La anfetamina posee una estructura química muy similar a las catecolaminas. debido a esta analogia estructural se caracterizan por tener propiedades simpaticomiméticas actuando sobre los receptores alfa y beta-adrenérgicos del sistema nervioso central. Por otra parte la presencia de grupos metilo en el lado alfa del nitrógeno de la cadena resulta en que le

confiere a la molécula propiedades inhibitorias de la acción de la enzima monoaminoxidasa, impidiendo la degradación de catecolaminas(33).

4.4.3.- MECANISMO DE ACCIÓN

Las anfetaminas actúan en las vías de recompensa cerebral (sistema mesolímbico), causando acentuada liberación de dopamina del terminal presináptico, consecuentemente se incrementa la actividad dopaminérgica en el sistema de recompensa, prolongándose los efectos de este neurotransmisor en el terminal sináptico, debido a un aumento en la concentración de dopamina por bloqueo de la recaptación de dopamina y noradrenalina(23,22).

4.4.4.- MÉTODOS DE DETECCIÓN

La anfetamina y metilamfetamina son excretadas sustancialmente inalteradas en orina y por lo tanto los métodos de detección son hacia los compuestos derivados de estas(10). La metodología utilizada para la detección de anfetaminas en fluidos biológicos a lo largo de la historia ha sido a través de técnicas cromatográficas, fluorometría, microcristalografía, métodos colorimétricos, procedimientos espectrométricos ultravioleta, métodos de fluorescencia, radioinmunoensayo y enzimoimmunoensayo, siendo los métodos de inmunoensayo en la actualidad los más utilizados en

laboratorios clínicos para investigación en orina humana, así como la cromatografía a gas, como técnica confirmatoria(21,10).

Debido a los inmunoensayos proveer sólo un resultado presuntivo, se torna imprescindible utilizar técnicas analíticas alternativas específicas basadas en un método químico distinto para obtener un resultado analítico confirmatorio, particularmente la cromatografía a gas-espectrometría de masas (GC-MS) es el método confirmatorio de elección(21), ya que puede ocurrir reacción cruzada en el test de inmunoensayo para anfetaminas con otras especies farmacológicamente similares(43). Algunos ejemplos de reacción cruzada en el test de inmunoensayo de anfetaminas pueden ser con la clorpromazina, ranitidina, cloroquina, N-acetilprocainamida, fentermina, efedrina y fenilpropanolamina(21).

4.4.5.- MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

En relación a la preparación de muestras, las anfetaminas al ser excretadas excelentemente en disolventes a pH mayor de 10, permite un coeficiente de partición favorable al uso de disolventes de baja polaridad, lo que alcanza una extracción más selectiva, el hexano, eter dietílico o eter diisopropil son todos alternativas convenientes al cloroformo. Estas drogas son bastante volátiles y pérdidas sustanciales pueden ocurrir durante la evaporación de extractos orgánicos.

En cromatografía en capa fina las anfetaminas deben ser

convertidas a una sal ácido volátil menor con reactivos, como ácidos tartárico, fosfórico y hidroclicóricos antes de evaporar a sequedad de nitrógeno. El ácido hidroclicórico es preferido y el exceso de ácido es eliminado durante la fase de evaporación. El eterdietílico es el disolvente de elección debido a su punto de temperatura de evaporación. Si bien puede practicarse una extracción directa de anfetamina sin la necesidad del disolvente para evaporación en un pequeño volumen (50 uL) de cloroformo de 2 mL de orina. Después de la centrifugación una cantidad de la microextracción es inyectado en el cromatógrafo a gas. El mismo principio ha sido usado en el método cromatográfico a gas capilar, usando el acetatobutil como disolvente.

4.4.6.- CROMATOGRAFIA A GAS

Las aminas volátiles tales como las anfetaminas, son ideales para adaptarse al análisis cromatográfica a gas, pero la elección de la columna es fundamental. Muchos sistemas disminuyen el rendimiento por picos asimétricos debido a la absorción sobre el material de soporte. Estos problemas pueden ser vencidos con pretratamiento del soporte con hidróxido de sodio o potasio para suprimir la ionización. Dos columnas la Apiezon L con 10% de hidróxido de potasio y la Carbowax 20M con 5% de hidróxido potásicos han provado su uso en laboratorio de rutina, siendo que estas columnas pueden usarse en cromatógrafos a gas con varios detectores. El inconveniente de esta técnica es el surgimiento de colas en los picos, estas

pueden ser eliminadas siendo las muestras con anfetaminas primero acetiladas con ácido anhídrico. la derivatización de anfetaminas se ha empleado en la cromatografía a gas y se ha incluido en el método la formación de trimetilsilil, tricloroacetil, trifluoroacetil, heptafluorobutiril, y pentafluorobenzoyl derivados. Todos estos disponibles para columnas SE-30, OV-1 y OV-17.

Las técnicas de derivatización con polifluoro cuando acoplado con detección de captura electrónica, incrementa marcadamente la sensibilidad de detección de anfetaminas en orina y niveles tan bajos como 10 ug/L son fácilmente detectados. Métodos convencionales no derivatizado y con detección ionización de llama ha detectado límites del orden de 100 ug/L. Sin embargo, estos procedimientos no son fáciles de estandarizar en pruebas de programas de rutina de drogas.

La columna capilar de sílica fundida permite con fuerza y reproducibilidad hacer una detección poderosa. En el caso del uso de detectores de ionización de llama y nitrógeno fósforo no es necesario derivatizar. Para lotes de muestras amplias un inyector split/splitless puede usarse, permitiendo el uso de jeringas cromatográficas convencionales con agujas de acero, las cuales son muy robustas.

4.4.7. Cromatografía a Gas-Espectrometría de Masas (GC-MS)

El espectro de masa por ionización de electrones de anfetamina no está muy discriminada y es usual realizar formas acetil o isotiocianato derivado previo al análisis. Los

fragmentos iónicos relevantes con masa/carga (m/z) 91 y 86 para el ácido benzóico y isotiocianato, siendo el ion molecular 177. Es posible diferenciar anfetamina, metilamfetamina y otras 9 aminas incluyendo efedrina, fenilpropanolamina, 3,4-metilendioximetilamfetamina y fentermina por cromatografía a gas y espectrometría de masa con SIM (sistema de monitorización iónica) después de derivatizar con anídrido heptafluorobutírico (HFBA) o 4-carboxihexafluoroburiril cloruro (4-CB). Debido a la disponibilidad de ionización química en ciertos tipos de bancos de espectrometro de masa, ha hecho posible diferenciar anfetamina y sus drogas análogas (metilendioximetilamfetamina) mucho más fácilmente.

4.4.8.- Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

El análisis de anfetamina con detección fluorescente y columna C18 en fase reversa fue referido en 1981. Recientemente un amplio procedimiento de investigación se ha desarrollado usando una técnica de preconcentración sobre una precolumna envuelta con absorbentes hidrofóbicos de cambio catiónico en serie. La identificación de las drogas sin derivatizar fueron por detección ultravioleta a 210 nm. Una amplia cantidad de tipos de anfetaminas con vasto rango de polaridad pueden ser detectados por este medio y el procedimiento puede ser totalmente automatizado. Otros trabajos se han concentrado sobre la detección de la excreción de productos hidroxilados de anfetaminas y metilamfetaminas.

usando extracción en fase sólida y detección electroquímica.

Los datos de retención por HPLC no son en media tan precisos como los alcanzados por cromatografía a gas. Además la técnica HPLC es menos selectiva que la GC. Por otra parte al no excluir compuestos polares y no volátiles, como consecuencia existe un potencial considerable para interferir con compuestos extraños especialmente cuando el detector no selectivo ultravioleta es usado.

4.4.9.- MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

El (RIA) radioinmunoensayo para anfetaminas en orina ha sido comercializado por Abuscreen, Roche diagnósticos, en el cual el anticuerpo se lanza contra la d-anfetamina y tiene elevado grado de especificidad. la reactividad cruzada significativa viene a ser con p-hidroxianfetamina y p-metoxianfetamina, unas drogas ilícitas alucinógenas. Si bien que no muestra reacción con dietilpropion, las muestras de orina de abusadores de drogas contienen metabolitos que pueden causar reacciones cruzadas. La reactividad cruzada con metilamfetamina es casi insignificante, pero resultados positivos pueden algunas veces ser obtenidos en orina debido a su conversión parcial a anfetamina. No obstante los ensayos no son un test de confianza para abuso de metilamfetamina, y esto es un claro inconveniente.

4.4.10.EMIT(Técnica de Inmunoensayo Múltiple Enzimático)

Los ensayos de detección policlonal de anfetaminas metilamfetaminas y otras drogas feniletilaminas, en particular efedrina, pseudoefedrina y fenilpropanolamina, las cuales están presentes en descongestionantes, y al ser este último un metabolito de dietilpropion, el abuso de esta droga es también detectado por el sistema EMIT.

El ensayo también exhibe reactividad cruzada con MDMA y MDEA, pero con rendimientos de resultados positivos para concentraciones grandes entre 5000-10000 ug/L. Syva ha desarrollado un equipo de confirmación para anfetaminas, el cual elimina interferencias de efedrina y fenilpropanolamina, pero no reacciones cruzadas de otras aminas. Un ensayo monoclonal EMIT d.a.u contiene 2 anticuerpos es más específico para d-anfetamina y d-metilamfetamina, y más sensible respecto a MDMA que el equipo policlonal. El equipo monoclonal sin embargo tiene reacción cruzada con algún metabolito de la fenotiazina y por lo tanto podría dar resultados falso positivos, particularmente cuando usado para investigar psicosis inducidas por drogas de abuso. Con el surgimiento reciente del EMIT II ensayo monoclonal ha sido más específico que el EMIT d.a.u monoclonal, mostrando reactividad cruzada con benfetamina, benmetrazina y fentermina, bien como con l-efedrina y mefentermina pero solo en elevadas concentraciones superiores a 200 mg/L. en suma la reactividad a d- y l-anfetamina, d- y l-metilamfetamina, MDA, MDMA, y MDEA.

Los ensayos no detectan clorpromazina, cloroquina, N-

acetil-procainamida, quinacrina, ranitidina, y tiramina, las cuales son detectadas por el sistema EMIT d.a.u monoclonal.

4.4.11.- FPIA (Inmunoensayo de Fluorescencia Polarizada)

En los equipos de test para diagnóstico de anfetaminas usadas en analizadores inmunoensayo de fluorescencia polarizada(FPIA), poseen anticuerpos que tienen igual reactividad respecto de la anfetamina y metilamfetamina y tienen muy baja reactividad cruzada respecto efedrina y fenilpropanolamina, tanto como el anticuerpo de la anfetamina del EMIT.

La ventaja de los ensayos monitorizados con drogas terapéuticas es que los instrumentos son calibrados una vez al mes probablemente permanecen estables por largos períodos. Un analizador más especializado como lo es el ADX tiene ventaja de analizar lotes de más de un analito de diferentes test en variedad de combinaciones en muestras en serie. Esta tecnología ha permitido habilmente cuantificar con exactitud concentraciones urinarias de drogas de abuso.

4.4.12.- REACTIVIDADES CRUZADAS DE INMUNOENSAYOS

La tabla 4 muestra una amplia idea del rango de reactividad cruzada encontrada con alguno de los inmunoensayos comerciales. Las muestras que dan resultados positivos a anfetaminas deben siempre ser reanalizadas por una técnica cromatográfica.

4.4.13.- TIEMPO DE DETECCIÓN

Después de una dosis de 10 mg de anfetaminas, concentraciones de ambas anfetaminas y metilanfetaminas alcanzan rango de 0.4 a 5 mg/L acima de las primeras 24 hs. Cambios en pH urinario pueden induzir profundas fluctuaciones en concentraciones de drogas tales que los ensayos menos sensibles (TLC,RIA) pueden dar negativo y otras muestras resultados positivos de un mismo individuo. En la práctica esto no es significativo porque los abusadores de anfetaminas consumen elevadas dosis y en todos los ensayos están descritos la detección de anfetaminas por lo mínimo durante 24 hs.

Drug	RIA	FPIA (TDx)	EMIT d.a.u. polyclonal	EMIT d.a.u. monoclonal	EMIT II
d-Amphetamine	100	90	100	250	100
dl-Amphetamine	50	100	100	100	67
d-Methylamphetamine	2.2	57	30	100	100
dl-Methylamphetamine	—	57	—	—	53
Diethylpropion	0*	0	0*	—	0.1
Ephedrine	0	0	30	2	0.7
Fenfluramine	—	22	33	10	—
Mephentermine	0	6	75	10	10
Methylenedioxymphetamine (MDA)	327	465	2.6	100	33
Methylenedioxymphetamine (MDMA)	0.6	84	2.8	33	17
Phenylethylamine	1	2	32	10	0.2
Phenmetrazine	0.1	0	30	1	17
Phentermine	1.7	6	75	333	50
Phenylpropanolamine	2	0	30	1.3	0.4
Pseudoephedrine	0	0	30	1	0.3

*Significant cross-reactivity with urinary metabolites

RIA = Radioimmunoassay; FPIA = fluorescence polarization immunoassay; EMIT = enzyme multiplied immunoassay technique.

Tabla 4. Relativas reactividades cruzadas de anfetaminas en varios inmunoensayos. Tomado de Ann.Clin.Biochem.1995

4.4.14.- RECOMENDACIONES

En la tabla 5 observamos comparativamente datos por sensibilidad de técnicas de detección de anfetaminas en orina, velocidades y costo en equipos. Las anfetaminas son drogas menos ampliamente abusadas que los opiáceos, y la mayoría de los laboratorios clínicos químicos refieren incidencias de detección de menos del 15% en muestras de drogas de abuso en centros de tratamiento.

El buen censo recomienda aplicar un método de inmunoensayo para investigar la elevada proporción de muestras negativas. Las muestras positivas por inmunoensayo pueden entonces ser confirmadas por técnicas cromatográficas.

El sistema Syva EMIT d.a.u policlonal es recomendado como investigación preliminar por lo siguiente: - puede detectar algunas drogas relacionadas con anfetaminas (fentermina, mefentermina, efedrina) las cuales son abusadas.- puede ser adaptado para uso en equipo de analizador clínico químico ya existente, y - los costos de reactivos son mucho menores.

	EMIT (d.a.u.)*	RIA (Roche)	FPIA (TDx)	TLC	GC	HPLC	GC/MS
Sensitivity ($\mu\text{g/L}$)	300 [†]	5	90	1000	300	500	5-10
Turnaround time for one test	3 min	30 min	5 min	1 h	20 min	20 min	1 h
Test/8 h day	300	300	300	100	100	100	10
Equipment costs (£)	25 000 [‡]	10 000	25 000 [‡]	1000	10 000	10 000	35 000

*Syva EMIT d.a.u. polyclonal amphetamines kit.

[†]Manufacturer's recommended threshold concentration.

[‡]Manufacturers of these systems often provide and maintain the equipment in return for a guaranteed rate of reagent purchase.

EMIT = Enzyme multiplied immunoassay technique; RIA = radioimmunoassay; FPIA = fluorescence polarization immunoassay; TLC = thin-layer chromatography; GC = gas chromatography; HPLC = high-performance liquid chromatography; GC/MS = gas chromatography/mass spectrometry.

Tabla 5. Comparación de técnicas de detección de anfetaminas.

Tomado de Braithwaite y col.(10)

Caracterizada el tipo de droga anfetamínica presente, el cromatógrafo a gas es el método de elección preferible con el uso de columna capilar y detector nitrógeno fósforo. Esta técnica es mucho más selectiva que el TLC y HPLC, puede ser fácilmente automatizada y el costo de manutención es bajo.

La probabilidad de identificación correcta para los tipos de drogas anfetamínicas es la combinación de inmunoensayo y cromatografía a gas, siendo completamente suficiente para situaciones clínicas. Para casos médico legales sin embargo, es esencial técnica más definitiva y específica como lo es la cromatografía a gas - espectrometría de masas(10).

4.5.- CONSIDERACIONES ACTUALES SOBRE EL METABOLISMO DE LAS BENZODIACEPINAS

4.5.1.- INTRODUCCIÓN

Las benzodiacepinas están entre los fármacos más comunmente prescritos en el mundo(27.18). Son utilizados principalmente para el tratamiento de desordenes de ansiedad y insomnio. Considerando su extendido uso en prescripciones médicas. el abuso intencional de benzodiacepinas es relativamente raro(27). La molécula original protótipo de las benzodiacepinas clásicas es el clordiazepóxido sintetizada en 1961. pertenecen a este grupo el flurazepan, oxazepan y lorazepan.

La facil y comoda administración por via oral ha difundido su enorme consumo y abuso. asi como por su capacidad para inducir euforia y sensación de autocomplacencia. sobre todo si combinada con alcohol(21.18). Las benzodiacepinas son compuestos que fueron introducidos con la finalidad de reemplazar los barbitúricos y su uso es estrictamente terapéutico como tranquilizantes. hipnóticos. anticonvulsivantes y relajantes musculares(1).

Cuando una benzodiacepina es tomada por más de varias semanas. ocurre una pequeña tolerancia y no ocasiona dificultad de detener la medicación cuando existe la orden médica de detener la administración de esta droga. Sin embargo transcurridos algunos meses de consumo la proporción

de pacientes que desarrollan tolerancia es elevada y al reducir la dosis o detener la medicación les produce síndrome de abstinencia(tabla 6)(27). Puede ser difícil distinguir síndrome de abstinencia de la reaparición de los síntomas de ansiedad, que causó las benzodiacepinas al ser prescrita inicialmente. Algunos pacientes pueden aumentar su dosis extraordinarias porque la tolerancia sin lugar a dudas desarrolla efectos sedativos. La función de la tolerancia es mantener el balance homeostático para que el funcionamiento fisiológico continúe dentro del rango normal, a pesar de los efectos de la droga como agente externo(33). Este mecanismo de tolerancia es traducido por la adaptación neuronal al suministro crónico de la droga(22).

Muchos pacientes y sus médicos, no obstante afirman que los beneficios ansiolíticos continúan a ocurrir mucho tiempo después de la tolerancia a los efectos sedantes. Además estos pacientes continúan a tomar la medicación por años de acuerdo a las orientaciones médicas sin aumentar su dosis. El grado de tolerancia que se desarrolla a los efectos ansiolíticos de las benzodiacepinas es controvertido. El intermitente uso de benzodiacepinas cuanto a síntomas retarda el desarrollo de tolerancia y es por lo tanto preferible al uso diario. Pacientes con antecedentes de abuso de alcohol o otras drogas incrementan el riesgo para el desarrollo de abuso de benzodiacepinas y deben pocas veces ser tratadas con benzodiacepinas(27).

4.5.2.- FARMACOLOGIA

La estructura química de las benzodiazepinas está constituida por la fusión de un núcleo bencénico con un anillo diazepínico, son sustancias en general de carácter básico, liposolubles(2,3), cuya acción se caracteriza por su efecto selectivo en función de la lipofilidad sobre el sistema nervioso central y por producir depresión nerurológica.(figura 12)

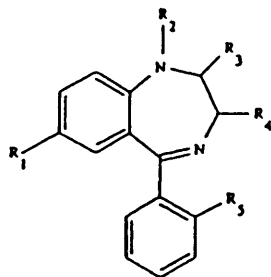


Figura 12. Estructura general de una benzodiazepina

Tomado de COLE.M.D.(1)

La benzodiazepina es fundamentalmente un fármaco hipnótico sedante(33), que posee propiedades miorelajantes, hipnóticas, ansiolíticas, tranquilizantes y anticonvulsivantes. Su importancia está en su capacidad de influir en el comportamiento causando efectos de sedación, desinhibición y hipnosis(18). Actúan inhibiendo la actividad cerebral en que participa la neurotransmisión GABA, esta es considerada la base molecular que explica los efectos sedativos.

anticonvulsivantes y relajantes de las benzodiacepinas(22).

El consumo en pequeñas dosis de benzodiacepinas conlleva a una reducción de la actividad motora espontanea y de la ideación, siendo esta por tanto una acción terapéutica en el control de la ansiedad. Por otra parte cuando se administra dosis elevadas se produce depresión de los centros corticales superiores que inhiben los núcleos de la base encefálica, que conlleva a la euforia y a una alteración en la capacidad de juicio y pérdida de autocontrol llevando a un comportamiento desinhibido(21). La sobre dosis puede conducir a la depresión de centros vitales que regulan reflejos cardiovasculares y respiratorios inclusive al coma.

El mecanismo de acción de las benzodiacepinas se fundamenta en la existencia de los receptores para benzodiacepinas en el cerebro localizados fundamentalmente en la corteza cerebral, hipocampo y amígdala y en menor cantidad en tálamo y tronco cerebral. Los receptores para benzodiacepinas hacen parte de un complejo proteico llamado GABA-A, que es un subtipo de receptor para el neurotransmisor GABA. Las benzodiacepinas se ligan en un sitio específico del receptor GABA-A y en presencia de GABA potencian el efecto fisiológico mediado por este neurotransmisor. El GABA incrementa la permeabilidad de la membrana neuronal al ion cloruro lo que permite la entrada del ion (Cl) al interior de la neurona, esto produce un aumento del potencial negativo de la membrana, lo que conduce a la hiperpolarización de la neurona(22). Los efectos clínicos de las benzodiacepinas son

consecuencia de la estimulación de la inhibición de los receptores GABA mediada por el ácido c-amino butírico(18).

4.5.3.- METABOLISMO Y FARMACOCINÉTICA

Las benzodiacepinas como el clordiazepóxido, oxazepan, alprazolán, son absorbidas lentamente después de una administración oral. El diazepam sin embargo es rápidamente absorbido alcanzando picos de concentración en plasma en cerca de una hora en adultos. Sobre todo aquellas benzodiacepinas de elevada liposolubilidad son absorbidas más rápidamente(21), con un rango que varía entre 0.5 a 8 hs. para las diferentes benzodiacepinas(18). Las benzodiacepinas alcanzan la circulación sistémica en la forma de su metabolito activo, la mayoría de las benzodiacepinas y su metabolito activo están unidas a proteínas plasmáticas cerca del 85 a 95% con un volumen de distribución alto. La extensa unión con proteínas está correlacionada fuertemente con la solubilidad lipídica de las benzodiacepinas(33). El grado de liposolubilidad inversamente proporcional determina la duración de los efectos en virtud de que las moléculas poco solubles manifiestan un menor aclaramiento plasmático y volumen de distribución, con una vida media más prolongada(21). (tabla 6)

METABOLITO ACTIVO	INDICACION PRINCIPAL	DOSIS DIARIA ² (mg)	VIDA MEDIA PLASMÁTICA (horas)	NIVELES TERAPÉUTICOS PLASMA (µg/L)	METABOLITOS PRINCIPALES EN ORINA
Clorodiazepóxido ¹	A	10-100	6-27 [20]	250-2500	Oxazepam, Demoxepam
Clorazepato ¹	A	15-60	Ultra-Corta	-	Oxazepam
Diazepam ¹	A	5-40	20-50 [35]	100-1500	Oxazepam, Temazepam
Halazepam ¹	A	40-120	= 35	20-150	Oxazepam
Ketazolam ¹	A	15-60	= 1,5	= 20	Oxazepam
Medazepam ¹	A	10-40	Corta	100-1000	Oxazepam
Prazepam ¹ [nordiazepam] ¹	A	10-60	Ultra-Corta 40-100 [50]	- 100-2000	Oxazepam Oxazepam
Flurazepam	H	15-30	2-3	= 50	Hidroxietylflurazepam
Quazepam	A, H	15-30	25-40	5-50	3-Hidroxi-quazepam
Oxazepam	A	15-60	4-11 [8]	150-1500	Oxazepam
Temazepam	A	10-60	8-38 [15]	100-1000	Temazepam
Lorazepam	A	1-8	9-25 [13]	10-100	Lorazepam
Lormetazepam	H	1-2	9-15 [11]	2-30	Lormetazepam
Bromazepam	A	3-9	10-25 [12]	10-250	3-Hidroxi-bromazepam 3-Hidroxi-ABBP
Nitrazepam	H	5-10	18-57 [28]	10-150	7-Acetamidonitrazepam 7-Aminonitrazepam
Flunitrazepam	H	0,5-2	9-25 [15]	5-50	7-Aminoflunitrazepam
Clonazepam	AC	0,5-10	20-50 [30]	10-100	7-Animoclonazepam 7-Acetaminoclonazepam
Clobazam	AC	20-40	17-30	200-1000	4-Hidroxiclobazam 4-Hidroxidemetilclob.
Triazolam	H	0,125-0,5	1,5-3,5 [2,5]	5-15	Hidroxi-metil-triazolam
Alprazolam	A	0,25-3	7-18 [11]	5-60	Hidroxi-metil-alprazolam + Análogo benzofenoma
Midazolam	H	5-30	1,5-4 [2]	100-1000	Hidroxi-metil-midazolam 4-Hidroximidazolam
Estazolam	A	1-8	8-30	20-500	4-Hidroxi-estazolam
Brotizolam	H	0,125-1	2-8 [5]	5-20	1-Hidroxi-metil-brotizolam 4-Hidroxibrotizolam
Clortiazepam	A	5	5-15	50-200	1-Hidroxi-etyl-Desalquil- Clortiazepam
Loprazolam	H	0,5-2	3-13 [7]	3-15	Loprazolam N-óxido

Nota:

¹El Nordiazepam es el principal metabolito de estos fármacos.

El Clorodiazepóxido también es metabolizado hacia Norclorodiazepóxido y Demoxepam.

²A = Dosis ansiolítica aproximada, H = Hipnótica, AC = Anticonvulsionante. De todos modos, la mayoría de las benzodiacepinas se pueden utilizar en más de una indicación.

³Dosis aproximada.

⁴La mayor parte de los metabolitos se hallan presentes en la orina en forma de sulfato o glucuronato.

Tabla 6. Niveles plasmáticos, semivida y eliminación de las benzodiacepinas. Tomado de Monografía ABBOTT (21)

Las benzodiacepinas inducen enzimas microsomales hepáticas (18) (Figura 13), que metabolizan estas drogas por oxidación a metabolitos más solubles en agua para su eliminación en orina(22).

La vía metabólica puede ser por tres rutas la primera por dealquilación que origina la formación de metabolitos farmacológicamente activos como el nordiazepan a partir del diazepam con una larga duración de los efectos. El segundo mecanismo metabólico es la hidroxilación cuya reacción forma metabolitos con acción intermedia como el oxazepam a partir del nordiazepan y un tercer proceso es la conjugación con el ácido glucurónico que permite una rápida eliminación vía renal o biliar en función de la hidrosolubilidad del conjugado glucurónico(21).

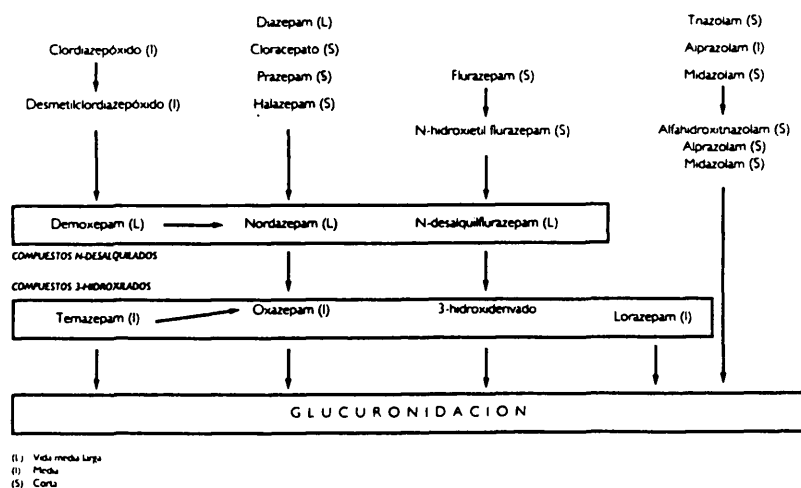


Figura 13. Metabolismo de las benzodiacepinas. Tomado de GONZÁLEZ, G.R. (18)

4.5.4.- MÉTODOS DE DETECCIÓN

En virtud de la amplia metabolización que experimentan las benzodiazepinas y consecuentemente formación de compuestos intermediarios que pueden interferir en su detección es que surgen los principales problemas analíticos.

4.5.5.- Métodos Inmunoquímicos

El método analítico inmunoquímico tiene la ventaja de permitir determinar una amplia gama de compuestos en plasma y en orina de forma rápida y segura. Entre los métodos analíticos más utilizados está el Inmunoensayo de Fluorescencia Polarizada (FPIA) cuya aplicación se destina fundamentalmente a muestras de orina, si bien que se aprecia un buen rendimiento en muestras de plasma. Por otra parte está el EMIT (Técnica de Inmunoanálisis de multiplicación enzimática) que se fundamenta en la lectura de la densidad óptica.

4.5.6.- Método Cromatográfico a Gas

La Cromatografía a Gas se utiliza actualmente como método de detección singular por su excelente especificidad y elevada sensibilidad con respecto a los métodos inmunoquímicos(21). Suele utilizarse la Cromatografía a Gas-Espectrometría de Masas (GC-MS) con la finalidad expresa de obtener la confirmación de los resultados de aquellas muestras que han tenido resultado positivo en el análisis presuntivo o

preliminar por inmunoanálisis(18).

Debido a los niveles de estas drogas ser muy reducidos en orina y otros fluidos biológicos el método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) no es suficientemente sensible para validar los datos cuantitativos obtenidos por esa técnica por lo tanto no es recomendable(21).

4.5.7.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La interpretación de los resultados obtenidos de un análisis de drogas de abuso como las benzodiacepinas en muestras de orina, está en función de las técnicas de laboratorio aplicadas en virtud de la sensibilidad y especificidad de cada una de ellas, así como del punto de corte de las mismas, además otra variable a considerar es la dosis terapéutica a que este sometido el paciente. Es por esta razón que debe tenerse el mayor cuidado de correlacionar los resultados obtenidos con la historia clínica del paciente(18).

Es de extrema utilidad la práctica de análisis de drogas de abuso "in situ" con procedimientos rápidos de inmunoensayo en muestras de orina, con la finalidad de detectar preliminarmente y de forma presuntiva los positivos a drogas de abuso para luego pasar a confirmación de las mismas por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.

5.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- POBLACIÓN

Nuestra investigación se desarrolló sobre muestras voluntarias y anónimas de dos poblaciones. la laboral de nuevo ingreso. la población de trabajadores de plantilla (ambas del sector transportes de Madrid) con 627 y 5000 muestras de orina respectivamente y se diseñó un protocolo en reconocimientos laborales para perfilar los positivos por tres técnicas de screening de carácter presuntivo y posterior confirmación de los positivos por GC-MS. también fueron analizada unas muestras de 111 pacientes trabajadores dados de baja de una clínica de rehabilitación ambulatorial en Madrid.

5.2.- APARATOS Y MATERIAL

- Cromatógrafo a Gas modelo 5890 con espectrómetro de masa
- Sistema ADX
- Sistema CEDIA D.A.U.
- Sistema COBAX Roche
- Balanza Analítica
- Bomba VAC ELUT SPS 24
- Sistema de flujo de nitrógeno
- Vidraria: - vasos graduados . - tubos de ensayo
- matraces . - viales
- pipetas graduadas
- dosificadores de reactivos

- microviales
- tubos de ensayo
- microjeringas de 10 uL

5.3.- REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- Beta-glucuronidasa
- KOH 10M
- Tampón acetato sódico pH 6.5 0.1M con 5% metanol
- Tampón fosfato pH 7 0.1M
- Tampón acetato sódico pH 4 0.1M
- Metanol
- Agua destilada
- HCl 0.1M
- Acetato de etilo
- Metanol:agua al 50%
- Hexano:acetato de etilo 75:25 al 1% de ácido acético
- Tolueno
- BSFTA bis (trimetilsil)-trifluoroacetamida para GC
- Cloroformo:isopropanol 80:20 al 2% de amoniaco
- Cloroformo
- PFPA anhídrido pentafluoro propiónico
- Hexafluoro propanol

5.4.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Fueron tomadas muestras de orina de las poblaciones supracitadas de forma voluntaria y anónimas, con previo consentimiento y a través de cadena de custodia, siendo analizadas en estas la presencia de 5 drogas y sus principales metabolitos a seguir: opiáceos(morfina, codeína, 6-monoacetilmorfina (6-MAM), cannabis(delta-9 tetrahidrocannabinol), cocaína(benzoyllecgonina, ecgonina-metilester), anfetaminas y benzodiazepinas. Fueron utilizados como estándares internos el levalorfanol para opiáceos y cocaína, y el ketoprofeno para el cannabis(THC).

Utilizamos un análisis preliminar semicuantitativo de reactivos para la detección de los metabolitos de las drogas en orina a través del sistema ADX línea Abbot División Diagnóstica(Alemania), ensayo ADX metabolito específico, utilizando la técnica FPIA(Inmunoensayo de fluorescencia polarizada), el cual permite detectar la presencia del metabolito por interacción molecular con sus respectivos anticuerpos marcados con fluoresceína.

Fue utilizado también el aparato COBAX Roche análisis semicuantitativo para detección de los metabolitos de las drogas de abuso en orina, cuyo principio consiste en una interacción molecular basado en la cinética de micropartículas en solución(KIM), que se procesa por modificaciones en la transmitancia de la energía luminosa(turbimetría).

Otro instrumento empleado en la detección de drogas de

abuso es el enzimoimmunoensayo CEDIA para análisis cualitativo y semicuantitativo cuyo principio del ensayo consiste en interacciones anticuerpo monoclonales específicos para las moléculas de los metabolitos, siendo de elevada especificidad y sensibilidad.

Apartir de determinados umbrales o puntos de corte (cut off) establecidos previamente por el fabricante, por un lado nos informa en carácter cualitativo preliminar si el test es positivo o negativo y por otra parte permite cuantificar la concentración de metabolito encontrado en orina.

Acto seguido las muestras de orina con resultados positivos en el test preliminar por inmunoensayo son pasadas por una técnica más específica y selectiva, la cromatografía a gas con detección por espectrometría de masa para su respectiva confirmación. Utilizamos la cromatografía a gas con detector de masa (GC/MS) para la confirmación definitiva de la presencia de los metabolitos de las drogas de abuso en orina por ser una técnica analítica física de separación de analitos de una mezcla de elevadísima sensibilidad y especificidad.

5.5.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Un tratamiento previo de la muestra es necesario antes de pasarla por el cromatógrafo, debido a que el metabolito de las drogas como los opiáceos y el cannabis son excretados via urinaria en forma conjugada con ácido glucurónico en su mayor parte. Ya esto no ocurre con la cocaína y sus metabolitos.

Si bien, es necesario someter la muestra de orina a un proceso de preparación que consiste en varias etapas que se describen a seguir.

1º) hidrólisis de la muestra en el caso de los opiáceos que son drogas básicas utilizando la beta-glucuronidasa(300uL) enzima específica para romper los enlaces ester formados entre el metabolito y el ácido glucurónico, se incuba la muestra de 12-24hs a 37°C. en esta etapa colocamos el patrón interno levalorfanol y un tampón fosfato pH 7.

Ya en el caso del cannabis que es una droga ácida la hidrólisis se procesa con potasa, añadiendo 300uL KOH 10M, añadimos también en esta etapa el patrón interno ketoprofeno(5uL) y el respectivo tampón acetato sódico pH7.

Utilizamos en la etapa de extracción del metabolito de la orina una columna ELUT CERTIFY I en el caso de los opiáceos y cocaína, ya la columna ELUT CERTIFY II es utilizada para extraer los metabolitos del cannabis. El relleno de estas columnas es de gel de sílica con propiedades químicas que facilitan interacciones moleculares del tipo hidrofóbicas y electrostáticas con los metabolitos de las drogas de abuso

anteriormente citadas encontrados en orina.

Se procede al acondicionamiento de la columna con disolventes con adecuadas polaridades en el caso de los opiáceos se utiliza metanol y agua, para la cocaína y sus metabolitos utilizamos metanol y tampón fosfato pH 6-7 0.1M y en el caso del cannabis metanol y tampón acetato sódico pH 6.5 0.1M.

Se pasa la muestra por la respectiva columna lentamente conectada a una bomba al vacío VAC ELUT SPS 24. Acto seguido se procede a lavar la columna con disolventes con polaridades capaces de eliminar las sustancias no deseables que hayan quedado retenidas en la columna junto con el metabolito, pero que no remuevan en esta etapa el metabolito retenido. Para opiáceos usamos agua, tampón acetato sódico y metanol, en el caso de cocaína lavamos con agua, HCL 0.1M y metanol, para el cannabis utilizamos metanol y acetato de etilo.

Enseguida se procede a la elución de los metabolitos de la columna, a través de la utilización de disolventes con polaridad capaz de remover de la columna los metabolitos, siendo recogidos en un tubo de ensayo. En el caso de los opiáceos y cocaína utilizamos cloroformo:isopropanol 80:20 al 2% de amoníaco, ya para el cannabis eluimos con hexano:acetato de etilo 75:25 al 1% de ácido acético.

Se prosigue con la evaporación en corriente de nitrógeno de toda la muestra eluida, se reconstituye con 250uL de cloroformo en el caso de opiáceos y cocaína, y con 250uL de tolueno en el cannabis. Se pasa a vial y se vuelve a evaporar

en corriente de nitrógeno.

Posteriormente se derivatiza con 100uL de anhídrido pentafluoro propiónico y 50uL de hexafluoro propanol en el caso de opiáceos y cocaína, para el cannabis se emplea 50uL de Bis(trimetilsil)-trifluoroacetamida para cromatografía a gas y 5uL de clorotrimetilsilosano. Esta etapa de derivatización es fundamental ya que propicia condiciones de volatilización a los analitos en la muestra propiedad indispensable para el análisis por cromatografía, así como protege sus grupos polares. Acto seguido se calienta la muestra derivatizada a 70°C durante 30 minutos para opiáceos y cocaína, en el caso del cannabis a 90°C durante 15 minutos después de temperar se pasa a microvial y se pincha en el Cromatografo a Gas-Espectrómetro de Masas(GC/MS) en el caso del cannabis. Ya para los opiáceos y cocaína debemos después de temperar reconstituir con 100uL de acetato de etilo. se pasa a microvial y se pincha en el GC/MS.

El estudio analítico cuenta con un sistema integrado cromatógrafo a gas con detector espectrómetro de masas modelo 5890. acoplado a un ordenador Hewlett Packard 386. a través de un programa que posee una base de datos con las informaciones de los distintos métodos empleados en el análisis de drogas de abuso y con sus respectiva libreria con los espectros de masa para análisis comparativos. que permite la identificación de la sustancia analizada una vez esta haber sido descompuesta en sus iones moleculares por el bombardeo de electrones del masas. como una huella química del compuesto. Finalmente el

ordenador está conectado a una impresora Hewlett Packard que imprime el cromatograma de la muestra analizada con su respectivo espectro de masas.

5.6 UMBRALES DE DETECCIÓN

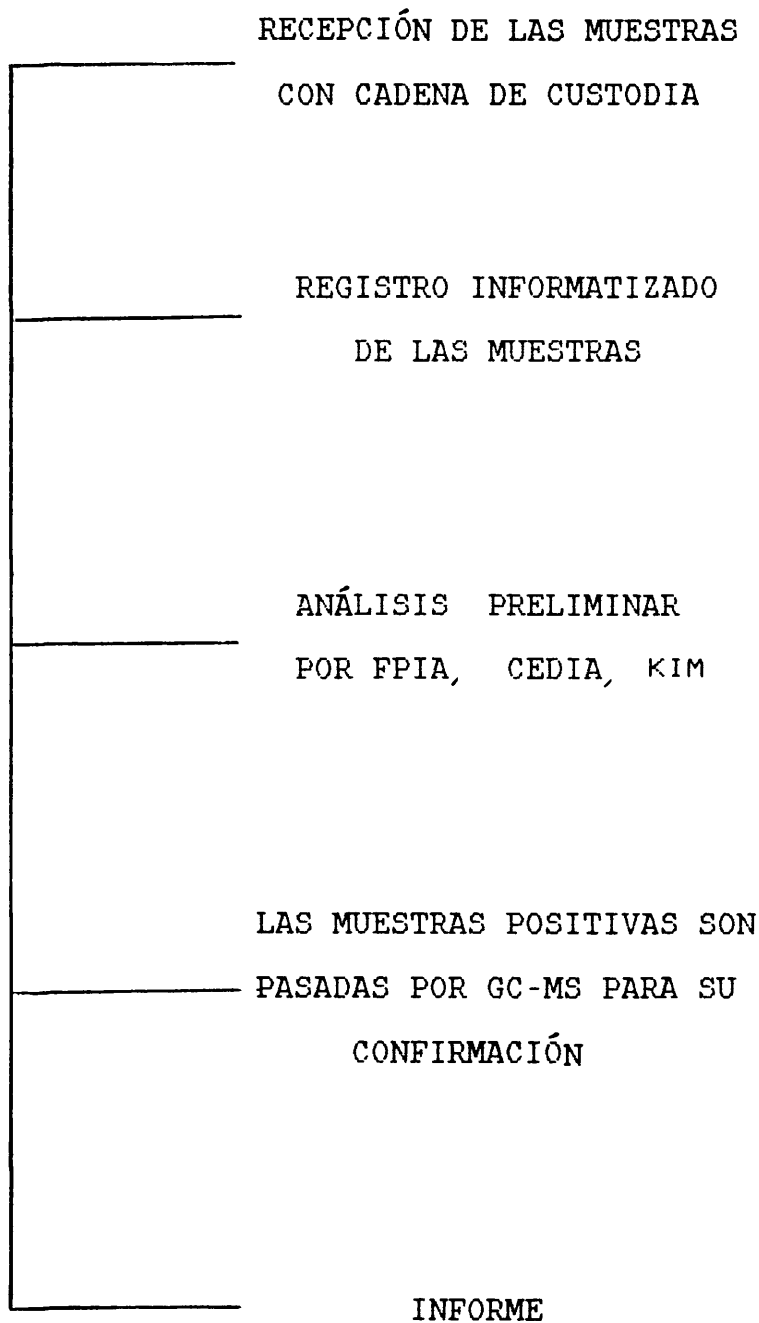
Los umbrales de detección o puntos de corte (cut off) con los que realizamos este trabajo, en los ensayos inmunoquímicos preliminares, están preestablecidos por el fabricante. Para el sistema ADX(FPIA), son: opiáceos 200 ng/mL, cannabis 25 ng/mL, cocaína 300 ng/mL, anfetaminas 300 ng/mL, benzodiazepinas 200 ng/mL. Para la técnica CEDIA los límites de detección son: opiáceos 300 ng/mL, cannabis 50 ng/mL, cocaína 300 ng/mL, anfetaminas 1000 ng/mL, y benzodiacepinas 300 ng/mL. En el caso de la técnica KIM Roche los límites de detección son para opiáceos 300 ng/mL, cannabis 50 ng/mL, cocaína 300 ng/mL, anfetaminas 1000 ng/mL, y benzodiacepinas 100 ng/mL (tabla 7) (44,56,49).

Sin embargo existe una polémica en relación al valor ideal por encima del cual determinado límite de concentración de los metabolitos de drogas de abuso en orina deberían ser considerados como positivo y abajo de cuales considerado negativo. Deberá no obstante ser escogido en nuestra opinión teniendo en cuenta como referencia la experiencia de un servicio de análisis toxicológico especializado de reconocido prestigio en el ámbito del país, a la luz de las recomendaciones del NIDA.

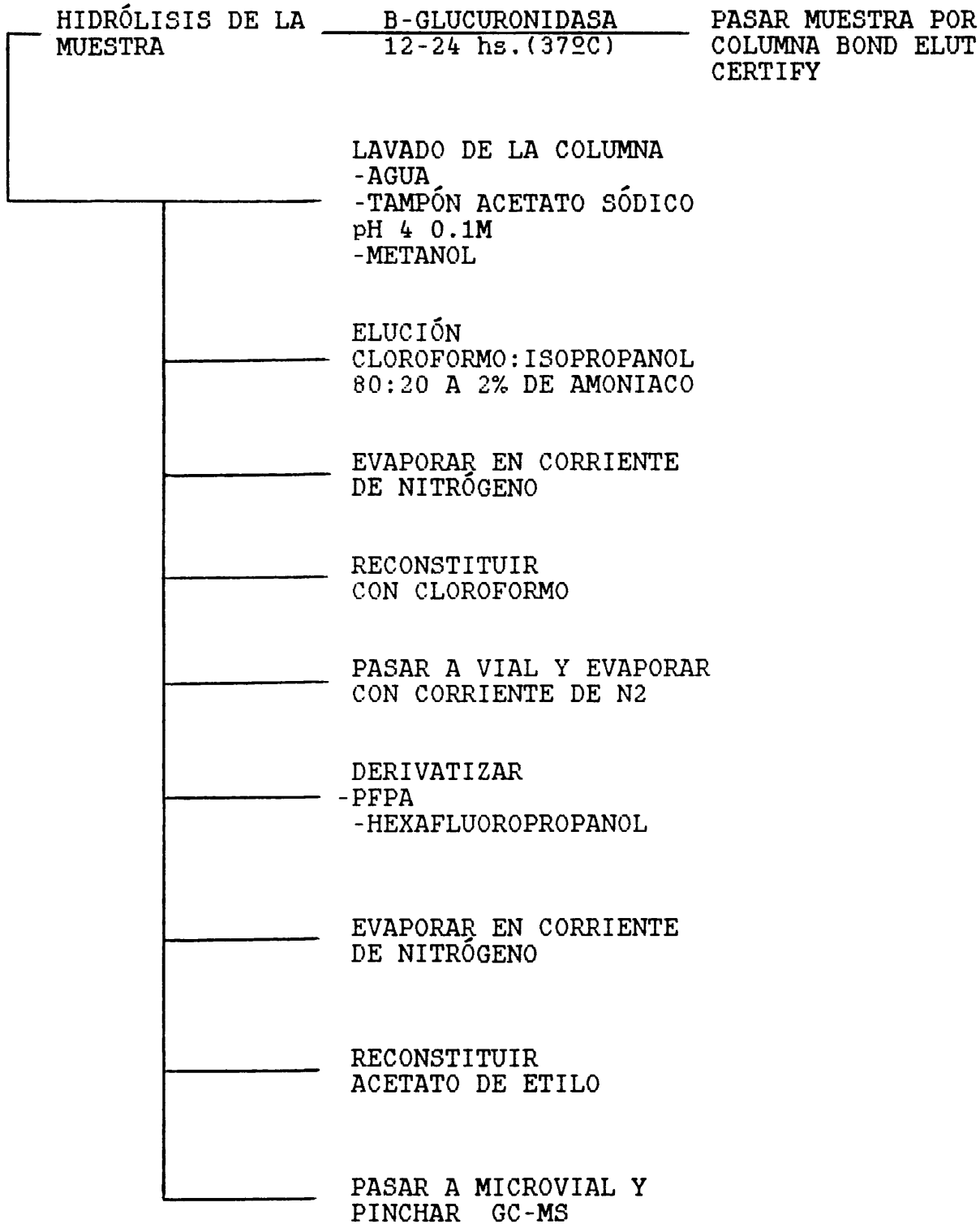
TABLA 7. LIMITES DE DETECCIÓN PARA DROGAS DE ABUSO

SISTEMAS	FPIA	COBAS	CEDIA
CUT OFF	ng/mL	ng/mL	ng/mL
OPIACEOS	200	300	300
CANNABIS	25	50	50
COCAINA	300	300	300
ANFETAMINAS	300	1000	1000
BENZODIACEPINAS	200	100	300

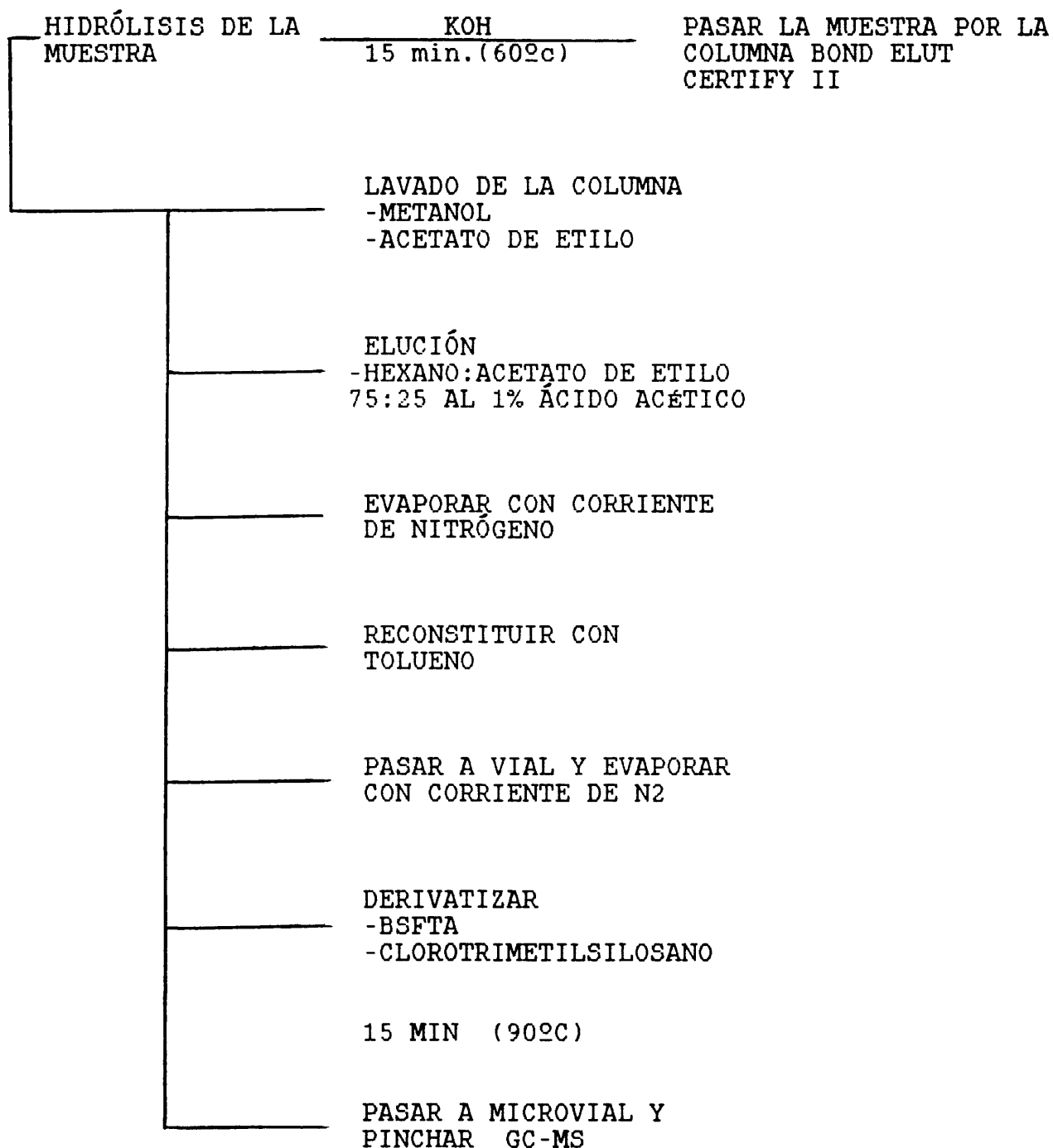
A seguir se presentan el esquema 1 Método para análisis de drogas de abuso. esquema 2 Método para determinación de opiáceos y sus metabolitos en orina. esquema 3 Método para determinación de cannabis(THC) en muestras de orina y esquema 4 Método para determinación de la cocaína y sus metabolitos en orina.



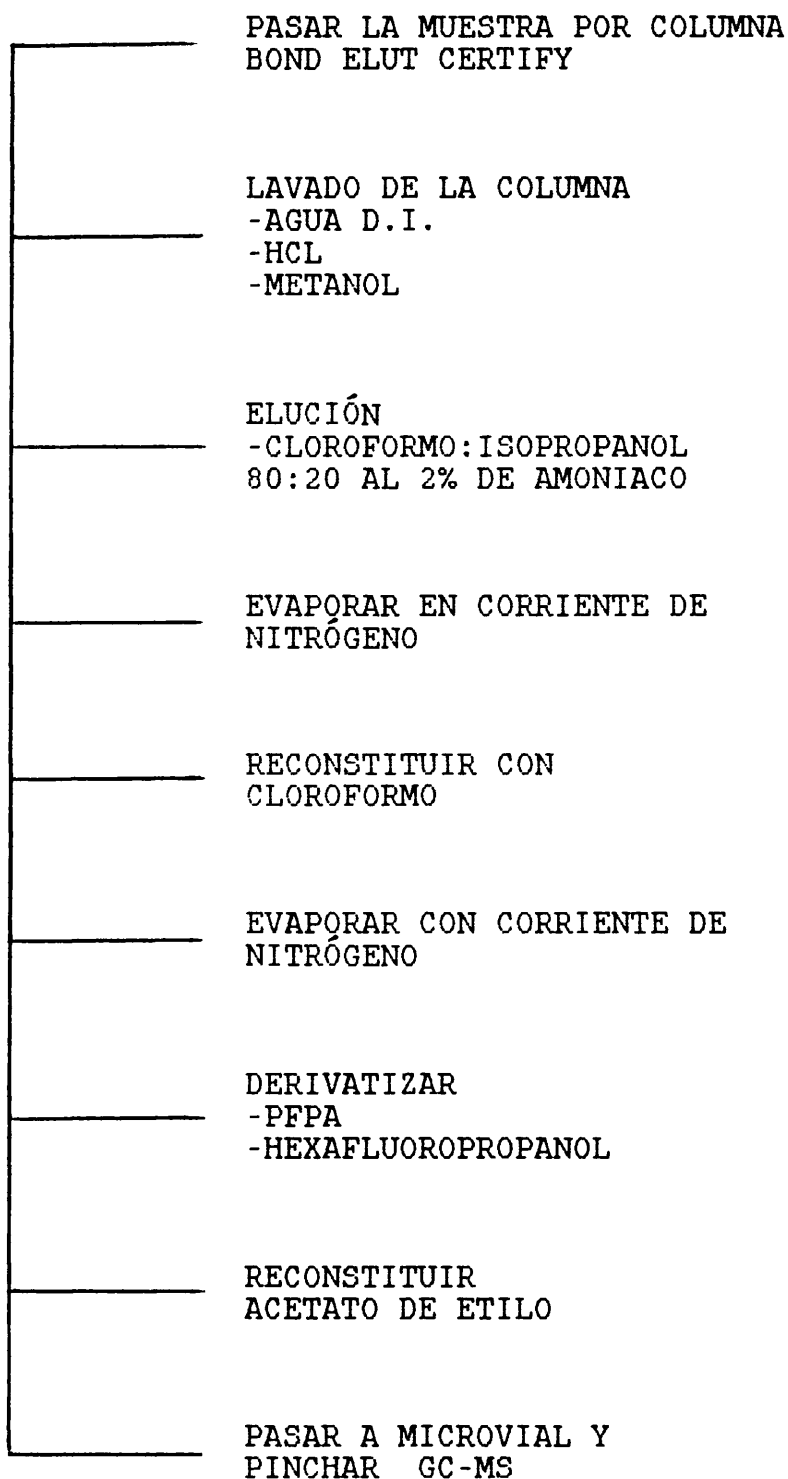
Esquema 1. Método para análisis de drogas de abuso.



Esquema 2. Método para determinación de opiáceos y sus metabolitos en orina



Esquema 3. Método para determinación de Cannabis (THC) en muestras de orina.



Esquema 4. Método para determinación de la cocaína y sus metabolitos en orina.

**6. - MÉTODO DE INMUNOENSAYO DE FLUORESCENCIA
POLARIZADA (FPIA)**

6.- Método de Inmunoensayo de Fluorescencia Polarizada

6.1.- Descripción de la Técnica

Los ensayos ADX de drogas de abuso proporcionan un medio preliminar para la detección de las drogas de abuso y sus metabolitos en orina, deben por tanto los tests con resultados positivos ser sometidos a una confirmación por un método más específico. El método confirmatorio de elección es la cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/MS). No es aconsejable sacar conclusiones de los resultados positivos de los ensayos ADX de drogas de abuso, para fines de empleo laboral ni de ningún otro tipo, sin efectuar antes análisis confirmatorios.

Los ensayos de drogas de abuso efectuados en orina han sido desarrollados con las características de funcionamiento para análisis de drogas en orina, difiriendo por tanto de aquellos en suero y sangre, cuanto al propósito e interpretación de resultados. Cuanto al análisis de drogas de abuso se deben informar los resultados como positivos siempre y cuando se confirme su positividad o bien a falta de confirmación el resultado sea identificado como no confirmado, debido a los eventuales conflictos de carácter legal, económicos, entre otros que puedan surgir asociados a una información o aplicación incorrectos de resultados erróneos.

El principio del procedimiento se caracteriza porque el sistema ADX utiliza una metodología de inmunoensayo de enlace competitivo, el cual un antígeno marcado con trazador compete

con el antígeno presente en la muestra por ocupar los puntos de unión de las moléculas del anticuerpo. Los participantes en esta reacción de enlace competitivo son: el anticuerpo conteniendo el reactivo, el antígeno que es la sustancia que se desea analizar en la muestra y el antígeno marcado con fluoresceína (complejo trazador-antígeno), contenido también en el reactivo (figura 14). Al producirse el enlace competitivo, cuanto mayor sea la cantidad del complejo trazador-antígeno que pase a formar parte de la molécula, mucho mayor del anticuerpo, menor será la cantidad del que quedará en la solución.

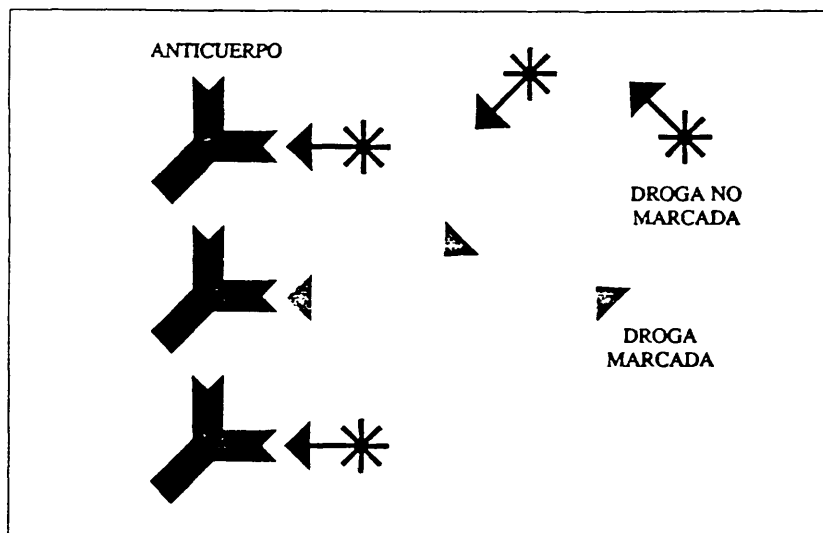


Figura 14. Principio de la unión competitiva, tomado de la Monografía Drogas de Abuso ABBOT, 1994.

Así si una muestra contiene una concentración baja de antígeno, cuando la reacción de enlace competitivo alcanza su estado de equilibrio habrá un aumento de concentración de trazador unido en la mezcla de reacción, y la polarización

será elevada. Ya inversamente si en la muestra analizada contiene una concentración elevada de antígeno al alcanzar la reacción de equilibrio, habrá una concentración baja de trazador unido en la mezcla de reacción y la polarización será baja. Utilizando los valores de polarización generado por cada muestra en el ensayo, se calculan las concentraciones de droga en las muestras a partir de una curva de calibración almacenada y los resultados se imprimen en unidades informables.

El método utiliza anticuerpos selectivamente dotados de reactividad cruzada. Los ensayos ADX de drogas de abuso detectan las drogas nativas y/o sus principales metabolitos dentro de una clase de fármacos. Una clase de fármacos se define como un grupo de drogas con estructuras químicas relacionadas.

El umbral o cut off de un ensayo ADX de drogas de abuso se define como la concentración de sustancia a partir de la cual indica la presencia o la ausencia de la droga o de sus metabolitos en la orina que está siendo analizada.

El sistema ha sido ajustado por el fabricante a un umbral específico para cada ensayo, siendo para opiáceos, cannabis, cocaína, benzodiacepina y anfetaminas los siguientes cut off: 200 ng/mL, 25 ng/mL, 300 ng/mL, 200 ng/mL y 300 ng/mL respectivamente.

La sensibilidad de los ensayos ADX equivale a la concentración mínima medible que puede distinguirse de cero, con un 95% de seguridad.

Contaminación por Arrastre: Las muestras para el análisis de drogas en orina pueden tener un amplio rango de concentraciones del analito, de tal forma que existe la posibilidad de transporte de la droga desde una muestra de alta concentración a otra muestra libre de droga, durante el pipeteo del ensayo. Para minimizar esta contaminación por arrastre el sistema está dotado de una rutina de pipeteo para los ensayos ADX de drogas de abuso que incluye frecuentes lavados de la sonda.

El analizador ADX incorpora una instalación con un vaso de lavado que permite el lavado interno y externo de la sonda.

La presencia de una droga o de sus metabolitos en orina es solamente una indicación de una exposición anterior a la droga. En ningún momento se pueden correlacionar las concentraciones de droga o de sus metabolitos detectadas en orina con niveles sanguíneos de estas sustancias, ni ser atribuidos a estas síntomas clínicos(44).

Los tests de investigación por Inmunoensayo de fluorescencia polarizada para drogas de abuso en orina son considerados de extrema importancia en la actualidad, como recurso de rastreo en estudios preliminares en poblaciones y por tanto tienen un carácter extrictamente presuntivo en caso de positividad a la exposición de una determinada droga, debido tener una elevadísima sensibilidad y especificidad. Sin embargo los tests presumiblemente positivos por esta técnica deben ser confirmados por una otra técnica de principio químico distinto preferiblemente cromatografía de

gases/espectrometría de masas. Si bien falta al inmunoensayo una especificidad expresivamente significativa para ser considerado un procedimiento definitivo como ocurre en análisis de drogas en casos forenses. No obstante por ser una técnica muy sensible no se debe subestimar sus resultados(45).

La técnica FPIA se basa en el principio de reacción antígeno-anticuerpo, de unión tipo competitiva, estando los anticuerpos marcados con moléculas que emiten fluorescencia(la fluoresceína) al ser expuestos a la luz. Se coloca en la muestra de orina a analizar un trazador que es la droga marcada con fluoresceína y que junto con el analito o droga presente en la orina son incubados con el anticuerpo específico y a seguir excitado con luz polarizada(figura 15), estableciéndose así la competición del analito con el trazador por la unión con el anticuerpo, existiendo una relación inversa entre la cantidad de analito en la muestra de orina y la intensidad de luz recibida por el receptor óptico del equipo instrumental. Esto significa que las lecturas elevadas de fluorescencia deben ser interpretadas como bajas cantidades de analito en la muestra y viceversa bajas lecturas de fluorescencia corresponden a elevadas concentraciones de analito en la muestra.

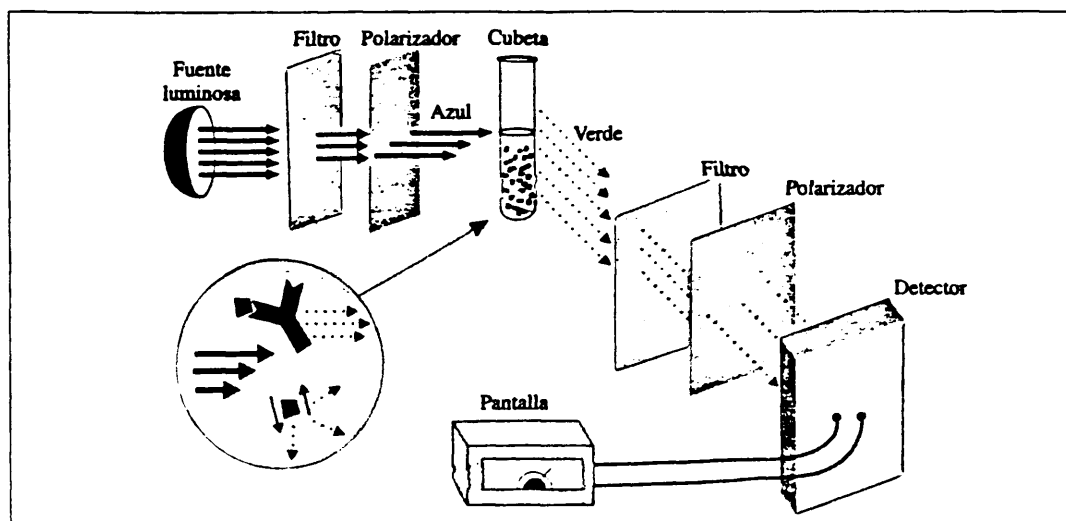


Figura 15. Principio del FPIA, tomado de la Monografía de Drogas de Abuso (ABBOT), 1994.

En virtud del FPIA seguir esta relación inversa permite alcanzar resultados muy precisos con concentraciones de drogas muy bajas. Esta relación inversamente proporcional entre la concentración del analito en la muestra y la cantidad de trazador unido al anticuerpo se fundamenta en la cinética de las moléculas en la solución. La fuente emisora del sistema emite una luz con una longitud de onda de 485 nm verticalmente polarizada, que excita la fluoresceína (fluoróforo) que a su vez emite luz fluorescente de longitud de onda entre 525-550 nm, siendo medido por el sistema óptico del FPIA que solo es capaz de medir esta longitud de onda con una polarización vertical. Las moléculas del trazador unidas al anticuerpo forman macromoléculas que rotan lentamente emitiendo fluorescencia polarizada verticalmente. Cuando el trazador

por el contrario está libre, realiza giros rápidos emitiendo fluorescencia con una orientación distinta, que no alcanza el sistema óptico del instrumento(21).

Fundamentalmente la prevención del consumo de drogas de abuso en población laboral y la tendencia cada vez más extendida en el mundo hacia la práctica de la monitorización de drogas "in situ". particularmente el seguimiento de empleados que realizan funciones de alto riesgo y responsabilidad como son manejo de armas, conductores de vehículos, entre otras, con el propósito de prevenir riesgos de accidentes(46) y educar para una vida sana sin abuso de drogas, es el objetivo de un programa antidrogas en empresas.

En un programa de screening de drogas es indispensable el control de calidad, de forma que todos los esfuerzos deben garantizar la reproducibilidad de los ensayos con elevada sensibilidad y especificidad de los métodos. Se debe tener particular cuidado en la interpretación de los resultados para no incurrir en errores, que pueden en algunos casos tener consecuencias desastrosas. Los resultados falsos positivos o falsos negativos de análisis de drogas son indeseados en situaciones donde los resultados están vinculados a algún asunto legal o acción similar hacia el donante de la muestra, en tales casos los resultados analíticos e interpretación pueden ser usados como evidencia de violación de contratos o reglas con consecuencias disciplinarias severas en el trabajo.

Se deben satisfacer los siguientes criterios en el uso de

los test de drogas de abuso para un programa antidrogas en empresas. cuando a) se sospeche que una persona está usando o comenzando a ser afectada por drogas de abuso. b) en la evidencia de presencia de intoxicación y/o disminución en el rendimiento laboral. c) cuando se sospeche que accidentes laborales son acreditados como resultado de intoxicación por drogas. d) en casos de control a través de pruebas aleatorias en empleados relacionados con actividades de seguridad y de elevada responsabilidad. como manejo de armas y conducción de vehículos.

El uso de pruebas de drogas de abuso en lugares de trabajo "in situ", en Estados Unidos de Norte América se está popularizando cada vez más, con el objetivo de fomentar la educación y conciencia de los efectos adversos que las drogas de abuso causan y minimizar consecuentemente la accidentabilidad laboral y el absentismo. La principal desventaja de los screening de drogas de abuso en muestras de orina es que los resultados positivos solo indican uso de drogas en un tiempo anterior a la colecta de la muestra, no pueden por tanto ser correlacionadas con este hallazgo efectos fisiológicos o comportamentales en función de concentraciones de drogas de abuso en orina. Si bien. los análisis cuantitativos en muestras de sangre son indicativos de su equivalente concentración en cerebro y efectos adversos sobre esfera cognitiva y comportamental del individuo consumidor de drogas de abuso.

La principal ventaja del FPIA es su eficacia y la

automatización instrumental en el análisis para numerosas drogas. Poco o ningún pretratamiento de la muestra es necesario y se requiere un mínimo de pericia del operador. Una desventaja de los inmunoensayos comerciales disponibles es su escasez de especificidad. Los anticuerpos a menudo ofrecen reacciones cruzadas relacionadas con otras especies químicas de drogas y sus metabolitos, manifestando así especificidad para una familia de sustancias químicamente relacionadas. Los resultados falsos negativos pueden ocurrir posiblemente debido a interferencias de sustancias o errores técnicos. Algunos resultados falsos positivos en inmunoensayos como benzodiaceñas y cannabis han sido relatados en la literatura relacionados con agentes antiinflamatorios no estereoides (AINE) tales como el ibuprofen. Los derivados de fenilamina como efedrina, pseudoefedrina y drogas anorexígenas interfieren con los inmunoensayos usados para anfetaminas. Los inmunoensayos para opiáceos no permiten diferenciar entre abuso de heroína del uso de una droga opiacea sin el uso de una técnica analítica de confirmación como la cromatografía de gases/espectrometría de masas(47).

En la actualidad los costes económicos, de salud y en la productividad de las empresas por el consumo de drogas de abuso son muy elevados en U.S.A., estando intrínsecamente correlacionado con el consumo de estas sustancias en los lugares de trabajo. De esto se desprende la necesidad imperiosa de poner en práctica programas de screening de drogas de abuso en los lugares de trabajo para controlar y

fomentar una educación continuada en los ambientes de trabajo al respecto del problema de las drogas de abuso y sus drásticas consecuencias, así como ser un medio de selección de personal principalmente en actividades consideradas de alto riesgo y responsabilidad, además de conseguir con esta medida disuadir el consumo de drogas de abuso, como también reducir el absentismo y la accidentabilidad laboral(48).

6.2.- Aplicación en muestras biológicas de orina

Los ensayos ADX para opiáceos, cannabinoides, cocaína, benzodiazepinas y anfetaminas es un sistema semicuantitativo para la detección de las drogas de abuso en muestras de orina y diseñado específicamente para estas, proporcionando un resultado preliminar del test analítico. Para obtener una confirmación de este resultado analítico debe usarse un método químico alternativo más específico. La Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas es el método de confirmación preferido. El método ADX para determinación de drogas de abuso utiliza la tecnología FPIA (Inmunoensayo de **Fluorescencia Polarizada**). Los resultados pueden informarse en términos cualitativos > o < que el umbral seleccionado, o bien en términos semicuantitativos en forma de concentración numérica y estos últimos permiten un control de calidad mensurable. Los resultados positivos deben confirmarse con un método adecuadamente sensible y específico basado en principio químico diferente. HPLC, GC, y la GC/MS. El Gases Masas se

acepta como sólida técnica de confirmación para todas las drogas porque ofrece el mejor nivel de fiabilidad en el resultado hasta el momento.

6.3.- Screening de 5 drogas de abuso y sus metabolitos en orina

La determinación de las drogas y o sus metabolitos en orina se realizan en el momento de la recepción de las muestras. El análisis se realiza de forma automatizada por FPIA, para las 5 drogas siguientes: opiáceos, cannabis, cocaína, anfetaminas y benzodiazepinas. Tomando como criterio para positividad de las muestras el respectivo punto de corte (cut off) de cada una de las drogas, que es un parámetro predeterminado para identificación de consumidores de drogas, siendo indiscutiblemente preciso en la comprobación de exposición a las drogas, la confirmación por gases masas de las muestra positivas. (figura 16)

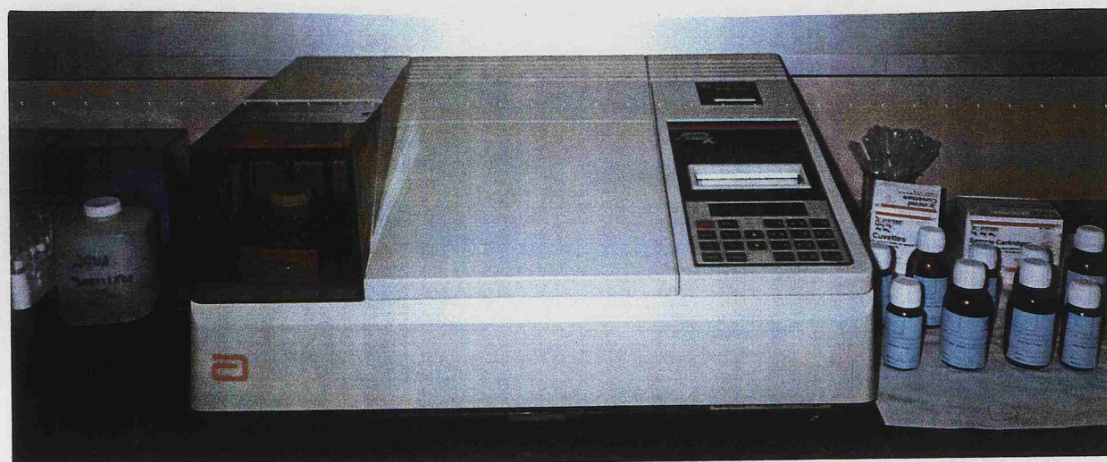


Figura 16. Aparato para FPIA

**7.- MÉTODO DE CINÉTICA DE MICROPARTÍCULA EN
SOLUCIÓN (KIM)**

7. Método KIM (Cinética de Micropartículas en Solución) para detección de drogas de abuso

7.1.- Descripción de la Técnica

Los análisis a través del Método KIM se fundamentan en un principio de interacción cinética de micropartículas en solución, siendo semicuantitativo y cualitativo. Esto ocurre por modificaciones producidas en la transmisión de la luz, siendo por tanto una **turbimetria**. Cuando nos encontramos con ausencia de droga en la muestra, tenemos que los anticuerpos libres en el reactivo específico para la droga en estudio se unen a los respectivos metabolitos conjugados a la micropartícula que se encuentra en otro reactivo específico para la droga a ser detectada, provocando en la muestra el surgimiento y formación de agregados que se aglutinan formando un precipitado. Por otra parte al entrar en contacto los anticuerpos con la muestra de orina en presencia de metabolitos de la droga, los metabolitos específicos compiten con el metabolito de la droga conjugado a la micropartícula por el anticuerpo libre, específicamente por los sitios de acción (receptores moleculares específicos). Entonces en esta situación el anticuerpo unido al metabolito específico de la droga ya no puede producir la aglutinación de las partículas, inhibiéndose así la formación de la turbidez característica de la presencia y formación de agregados de partículas.

La turbimetria va medir el grado de absorbancia que es influenciado por la concentración de la droga en la muestra,

Siendo que en la ausencia de la droga se produce un máximo en el incremento de la absorbancia, mientras que en la presencia de la droga o sus metabolitos en la muestra biológica (orina) produce una disminución de la absorbancia por impedir la aglutinación de las micropartículas, que es inversamente proporcional a la concentración de la droga en la muestra.

Existe un umbral o rango de valor medible en ng/mL, que se utiliza como parámetro de exactitud para cada droga en particular en el método KIM. La sensibilidad y especificidad a partir de los cuales se consideran positivas para drogas de abuso son los siguientes puntos de corte: para opiáceos 300 ng/mL, cannabis 50 ng/mL, cocaína 300 ng/mL, benzodiazepinas 100 ng/mL, anfetaminas 1000 ng/mL.

La positividad de reactividad cruzada con otras drogas no relacionadas, alcanzan valores del orden de 0.5% de reactividad cruzada. El resultado analítico por esta técnica deberá siempre ser confirmado por otro método químico más específico preferiblemente cromatografía de gases/espectrometría de masas(49).

El inmunoensayo de cinética de micropartículas(KIM), utiliza la metodología de interacción de micropartículas en solución. Todos los resultados presuntivamente positivos por este método deben ser confirmados por GC-MS. El método utiliza una partícula de latex de inhibición de la aglutinación del inmunoensayo. En el KIM el reactivo conjugado consiste de droga unido a micropartículas. Las micropartículas conjugadas en solución minimamente bloquean

la transmisión de la luz a través de una cubeta siendo la absorbancia baja. Cuando el anticuerpo de la droga es añadido al conjugado de la solución ocurre la formación de un enmarañado de anticuerpos con reacción cruzada de las micropartículas por unión a la droga. El resultado es una estructura enrejada que efectivamente bloquea la transmisión de la luz y disminuye la absorbancia. La presencia de droga libre en la muestra de orina no interfiere con la formación de este enrejado de anticuerpos y la absorbancia aumentará por encima de un dado tiempo. Si la muestra de orina contiene la droga de interés esta es mezclada con los reactivos, la droga no conjugada en la muestra competirá con la droga conjugada por los sitios de unión del anticuerpo, y el grado de formación del enmarañado de anticuerpos es inhibido de forma proporcional a la concentración de la droga en orina.

La diferencia entre las lecturas de absorbancia medidas inicial y final disminuye con el incremento de la concentración de droga(figura 17)(50).

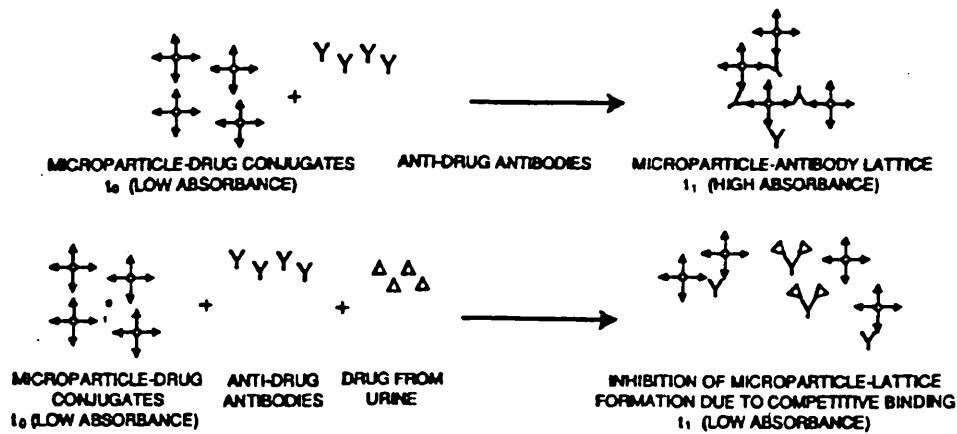


Figura 17. Principio metodológico del KIM, para una orina negativa (arriba), y para una orina conteniendo analitos. Tomado de ARMBRUSTER, A.D e cols. (45)

La droga presente en la muestra de orina inhibe la interacción de las micropartículas en proporción a su concentración en la muestra (51).

En los programas de screening de drogas de abuso, son utilizados los métodos de inmunoensayos muy frecuentemente asociados a un método de confirmación GC/MS, debido a la baja especificidad del ensayo y la probabilidad de ocurrir reacciones cruzadas con otras especies químicas estructuralmente similares, produciendo resultados falso positivos (52,53).

Los inmunoensayos son de relevante utilidad en pruebas de drogas en análisis de muestras forenses. No obstante en el caso de los opiáceos puede ocurrir ambigüedades de interpretación, principalmente con relación a si la presencia

de morfina y la ausencia de codeína puede o no ser un indicador válido de que la morfina o la heroína fue administrada, porque puede haber ocurrido por administración de codeína. La interpretación de los resultados en opiáceos requiere una comprensión de las cinéticas de eliminación de ambos metabolitos de la droga, su forma libre y la forma conjugada(14).

Las pruebas de screening de drogas de abuso en orina se han tornado populares y controvertidas, debido a la capacidad de identificar y cuantificar los analitos en la muestra. Los tests pueden dividirse en dos tipos de procedimientos: 1-Las pruebas de screening presuntivas, las cuales tienen por finalidad intentar identificar de forma simple, rápida y económica los analitos de drogas de abuso contenidos en la muestra, y el otro tipo de test de confirmación, que puede confirmar la identificación. Los inmunoensayos y los métodos cromatográficos son considerados como métodos presuntivos de pruebas de screening, mientras que la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) es un procedimiento confirmatorio. La seguridad del uso de inmunoensayos para detección de drogas de abuso en orina depende de la especificidad del anticuerpo, del significado de la detección de la droga y sus metabolitos, de la variabilidad de la señal de detección y de la capacidad del personal que ejecuta el test. Los inmunoensayos dependen de la unión de un analito al anticuerpo siendo la especificidad del anticuerpo hacia el analito dependiente de como el analito fue pegado al antígeno

transportador. Debido a cambios en puntos de contacto del antígeno sobre el analito, puede ocurrir reactividad cruzada de un anticuerpo. La especificidad también depende de si el analito tiene una única estructura que difiere significativamente de cualquier otra estructura que pueda estar presente en la muestra. Por ejemplo los ensayos Abuscreen-morfina tienen reacción cruzada muy significativa con codeína, los ensayos de anfetaminas con la fenetilamina, los ensayos de cannabinoles designados para el ácido delta-9-tetrahidrocannabinol(THC-COOH), tienen reacción cruzada con otros cannabinoles(54).

7.2.- Aplicación en Muestras Biológicas de orina

Los métodos KIM para instrumentos Cobas Mira fueron diseñados para análisis de drogas específicamente en muestra de orina, y para las características intrínsecas de esta muestra.

7.3.- Screening de 5 drogas de abuso y sus metabolitos en Orina.

Se procedió en los ensayos a identificar en orina 5 drogas de abuso y sus metabolitos: Opiáceos, Cannabis(delta-9-tetrahidrocannabinol), Cocaina(benzoyllecgonina,ecgonina metilester), Benzodiazepinas y Anfetaminas, cuyos resultados se encuentran en el apartado resultados y discusión.

**8.- MÉTODO DE ENZIMOINMUNOENSAYO DONANTE DE
ENZIMA CLONADA (CEDIA)**

8.- MÉTODO CEDIA(Enzimoinmunoensayo donante de enzima clonada)

8.1 Descripción de la Técnica

La investigación de drogas de abuso a través del método CEDIA consiste en un enzimoimmunoensayo homogéneo, realizado *in vitro* para el análisis preliminar cualitativo y semicuantitativo de metabolitos de opiáceos, cannabis, cocaína, anfetaminas y benzodiazepinas, con la finalidad de diagnosticar el consumo o exposición a estas drogas.

Los resultados de estos test son preliminares y por lo tanto provisionales, que deberán comprobarse con un método analítico más específico, siendo de elección la cromatografía de gases/espectrometría de masa (GC/MS).

El ensayo se fundamenta en la enzima bacteriana Beta-galactosidasa dividida en 2 fragmentos inactivos a través de técnicas de ingeniería genética(55), que se recombinan espontáneamente, formando una enzima activa que reacciona con el sustrato(droga de abuso), ocasionando un cambio de color que puede cuantificarse por espectrofotometría.

El metabolito específico de la droga de abuso conjugado con una fracción inactiva de esta enzima B-galactosidasa compete con la droga de la muestra en busca de un sitio de fijación de anticuerpos. Si la muestra contiene el metabolito de la droga, esta se fija al anticuerpo específico, en este caso los fragmentos inactivos de la B-galactosidasa forman una enzima activa. Por otra parte si la muestra no contiene el

metabolito de la droga específico para la inmunoglobulina, el anticuerpo se fija al metabolito conjugado con la fracción enzimática inactiva impidiendo la formación de la enzima activa. La razón de B-galactosidasa formada está en función de la concentración de la droga en la muestra(56).

El método CEDIA para la investigación en orina de drogas de abuso es de confianza y eficaz fundamentalmente en la utilización de programas de rutina realizados para detectar drogas de abuso "in situ" en lugares de trabajo. Estos inmunoensayos son sencillos, rápidos, y con la ventaja de ser capaces de automatización para amplio número de muestras, siendo todas las muestras presuntivamente positivas por este método confirmadas con excelente fiabilidad por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

Observamos en la figura 18 una representación esquemática del principio del método CEDIA. En el caso A. en la ausencia de la droga o el metabolito en una muestra de orina ocurre la inhibición de la B-galactosidasa, y no se genera ningún producto después de adicionar el sustrato a la mezcla de la reacción. En el caso B. la droga o los metabolitos de la droga en una muestra de orina compiten con la enzima donante-droga conjugada(ED), por los sitios de combinación del anticuerpo de la droga(Ab). La actividad de las moléculas B-galactosidasa se forma y se completa en la proporción a la cantidad de droga o metabolito de droga presente en la muestra, siendo la conversión del sustrato o producto también proporcional a la concentración de la droga en la muestra (EA)

aceptor enzimático(57).

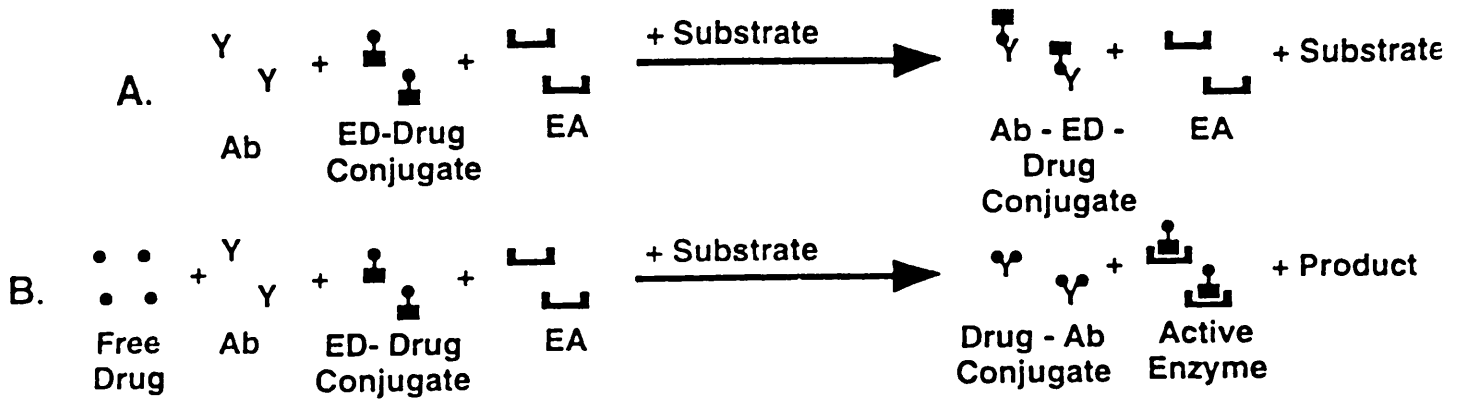


Figura 18. Principio del método CEDIA, tomado de Armbruster, A.D. y col. (57)

El análisis farmacocinético es un intento de describir experimentalmente datos en términos de un modelo cinético, de este modo se caracteriza la dosis o proporción droga/metabolito en relación con el tiempo. Los parámetros cinéticos por tanto pueden usarse para hacer predicciones cuantitativas(58).

En el enzoinmunoensayo CEDIA, la droga es marcada con un enzima compitiendo con la droga libre de la muestra del paciente en su unión al anticuerpo, por unión tipo competitiva. Siendo la concentración de droga o metabolitos determinada, a través de la medida de la cantidad de droga marcada enzimáticamente que queda libre en el medio de

reacción. Esta medida es realizada por un espectrofotómetro a partir de la reacción del enzima unido a la droga con un sustrato(droga específica) presente en la solución del ensayo, produciendo una sustancia coloreada que es detectable espectrofotometricamente. La reacción enzimática se inhibe cuando la droga marcada se une al anticuerpo, esto ocurre cuando no existe la droga en la muestra. En este caso el anticuerpo se une exclusivamente a la droga marcada con la enzima, lo que implicará en una reducción de la cantidad de enzima capaz de reaccionar con el sustrato, y con esto la intensidad de color que se detecta estará reducida.

Ya por el contrario, cuanto mayor es la intensidad de color detectable, mayor es la concentración de droga en la muestra del paciente, siendo que la variabilidad de coloración de la solución del ensayo en cuestión es directamente proporcional a la concentración de droga en la muestra(21).

La información que se desprende del inmunoanálisis de carácter evidentemente preliminar es de considerable importancia práctica, proveendo la base para la interpretación de la exposición a la sustancia abusiva, derivandose por tanto su presencia en niveles en plasma y orina en casos clínicos y forenses(59).

La correcta interpretación de resultados de los análisis por inmunoensayos requiere un entendimiento y comprensión de la cinética de eliminación de los metabolitos, así como de la propia droga, ya sea en su forma libre o conjugada. Es importante por otra parte considerar las varias y posibles

rutas de administración de la droga, en la medida que juega un papel relevante que influye y de la cual depende la ruta metabólica(14).

Los metabolitos de las drogas de abuso ilegales como los derivados de opiáceos, cannabis y cocaína, pueden utilizarse como indicadores o marcadores de exposición a esta sustancia en los análisis por inmunoensayos en muestras de fluidos biológicos como la orina. Siendo estos propuestos como marcadores específicos del consumo y abuso de drogas ilegales, que sufren un proceso de metabolización algunas como la heroína en la propia sangre por hidrólisis enzimática por colinesterasas plasmáticas, formando 6-Monoacetilmorfina, otras son metabolizadas por vía hepática enzimática, formando conjugados con ácido glucurónico y sulfatos, siendo finalmente clareados en el riñón y excretados en orina(11).

La interpretación exacta de un resultado positivo de un inmunoensayo a una droga ilegal como las anteriormente citadas, requiere un conocimiento de las propiedades cinéticas y metabólicas de la droga de abuso interpelada. Particularmente en el caso de los opiáceos debido al origen de los metabolitos codeína y morfina ser un punto controvertido, que puede generar confusión en la interpretación de resultados en tests de inmunoensayos positivos, en lo que se refiere a su formación ser derivado de consumo de heroína, o de consumo del fármaco codeína de forma indiscriminada y abusiva(13).

8.2.- Aplicación en muestras biológicas de orina

Los ensayos CEDIA para drogas de abuso, es un sistema enzimoimmunoensayo diseñado para el análisis y detección de drogas de abuso en muestras de orina. Es de elevada sensibilidad predictiva y especificidad. Habiendo sido utilizados los siguientes puntos de corte para este estudio según recomendaciones del NIDA. Para opiáceos 300 ng/mL, cannabis 50 ng/mL, cocaína 300 ng/mL, anfetaminas 1000ng/mL y benzodiacepinas 300 ng/mL.(figura 19)

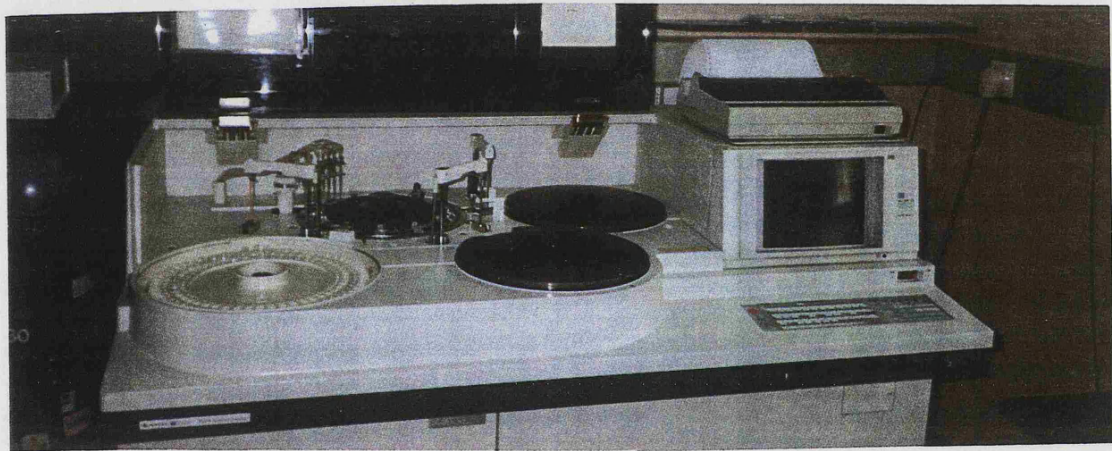


Figura 19. Aparato para CEDIA

8.3.- Screening de 5 drogas de abuso en muestras de orina

El análisis se realiza de forma automatizada para la determinación de las drogas de abuso a saber opiáceos, cannabis, cocaína, anfetaminas, benzodiacepinas y sus metabolitos en muestras de orina, siguiendo los criterios de positividad respecto a los puntos de corte(cut off) de cada una de las drogas, expresando su positividad apenas un significado de exposición a la sustancia, debiendo someterse las muestras positivas indiscutiblemente después de este análisis preliminar a la confirmación por GC/MS.

9.- MÉTODO CROMATOGRÁFICO A GAS

9.- MÉTODO CROMATOGRÁFICO A GAS

9.1.- Descripción de la Técnica

La Técnica Cromatográfica a Gas consiste en una metodología analítica física de separación de componentes o analitos de una mezcla determinada que se distribuyen entre dos fases, la fase estacionaria que es un lecho de superficie y la fase móvil que es un fluido que se infiltra a través del lecho estacionario(60).

En la actualidad existen diversas técnicas cromatográficas en función de la naturaleza de las fases, siendo en el estudio analítico de drogas de abuso particularmente usada la cromatografía Gas-líquido, donde la fase móvil es un gas el helio, denominado gas portador y la fase estacionaria es un líquido. Existen numerosas fases estacionarias disponibles para el análisis de drogas, las cuales poseen una variedad de polaridades (tabla 8)(1). Las diferencias en polaridades de las drogas, su peso molecular y su volatilidad es en lo que se basa fundamentalmente el proceso de separación(61,62). Los análisis toxicológicos son de extrema importancia en la identificación de drogas desconocidas en fluidos biológicos, apesar de la dificultad que se incrementa cuando los compuestos forman algunos metabolitos, que son factibles de identificar en muestras de orina. La cromatografía de gases/espectrometría de masa (GC/MS) es en la actualidad la técnica de mayor

sensibilidad y especificidad (63). En este método los analitos a identificar en la mezcla poseen diferentes afinidades por la fase estacionaria líquida, por lo que serán arrastradas por la fase móvil en distintos momentos en función de su coeficiente de reparto líquido-gas, separando los diferentes componentes de la mezcla en análisis, basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los analitos de la muestra al ser arrastrados por la fase móvil a través del lecho cromatográfico. Los analitos de la muestra interaccionan con la fase estacionaria, siendo arrastrados por la misma en función de la temperatura y coeficiente de reparto de estos con ambas fases.

En virtud de la técnica cromatográfica estar fundamentada en la termodinámica y la cinética, los aspectos termodinámicos son los que rigen el equilibrio de distribución o reparto de los analitos entre las dos fases, y por lo tanto responsables de características cromatográficas como la retención y la selectividad. La cinética participa en las separaciones cromatográficas, determinando el tiempo en que se consigue el equilibrio de distribución de cada plato teórico, unidades utilizadas para medir la eficacia de la columna cromatográfica(61). En este contexto la técnica cromatográfica es de extrema relevancia, debido a que permite identificar sustancias químicas(metabolitos) en función de sus propiedades físico-químicas. La muestra objeto del análisis es transportada por la fase móvil donde sus componentes atraviesan la columna cromatográfica que contiene la fase

estacionaria, ocurriendo la separación de los diversos analitos presentes en la muestra, dependiendo de las características físico-químicas de cada sustancia, siendo identificadas y cuantificadas por medio de detectores de elevada sensibilidad y especificidad (figura 20).

En el análisis por GC/MS la fase móvil es un gas inerte el helio, ya la fase estacionaria de la columna cromatográfica capilar es un líquido que se adsorbe a un sólido inerte, donde prevalecen los mecanismos de reparto (GLC) y tienen diversa permeabilidad a los gases portadores dependiendo del tipo de columna.

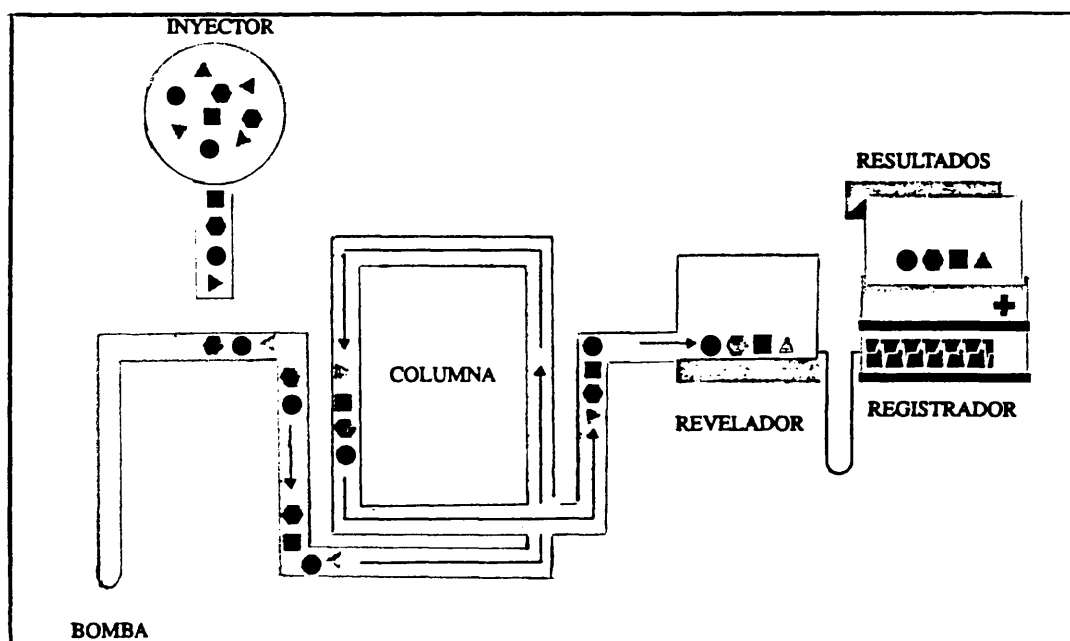


Figura 20. Principio de la Cromatografía en columna tomado de Monografía Drogas de Abuso (21)

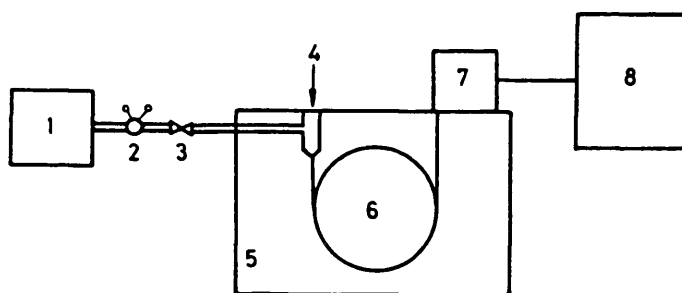
La técnica Cromatografía de Gases es de máxima fiabilidad en la determinación cuantitativa de analitos de drogas de abuso, sin embargo es necesario utilizar un patrón interno junto con la muestra al iniciar el procedimiento analítico, así se asegura el control del análisis y se reducen factores de variabilidad que acompañan a las diferentes fases de preparación, purificación y extracción de los metabolitos de la muestra(21).

Compuestos con elevado punto de ebullición en condiciones de bajas temperaturas de la columna presentarán coeficientes de reparto elevados implicando en que el detector los liberará lentamente, debido a que en estas condiciones su concentración en la fase móvil será baja. En caso contrario si la columna está condicionada a trabajar a temperaturas elevadas, encontraremos que los coeficientes de reparto de los componentes de la muestra de alto punto de ebullición disminuyen, lo que significa en que ocurre un decrecimiento del tiempo de análisis por aumento de las concentraciones de estos componentes en el gas portador, favoreciendo ser arrastrados hacia el detector. No obstante en estas condiciones de temperatura la separación de los componentes de la muestra pueden verse afectados debido a que al disminuir su tiempo de retención en la columna, puede ocurrir eluciones de los componentes muy próximos entre sí, impidiendo una resolución satisfactoria.

La cromatografía gaseosa se emplea particularmente para análisis de compuestos volátiles con punto de ebullición <

400°C o para compuestos que puedan constituir derivados volátiles, su principal limitación está en la labilidad térmica de los analitos, los cuales deben ser estables a la temperatura requerida para su volatilización, siendo por tanto la temperatura decisiva en una separación cromatográfica a gas.

El cromatógrafo de gases posee una estructura compuesta de 1)inyector por donde se introduce la muestra al sistema, 2)gas portador que transporta la muestra por la 3)columna cromatográfica hasta el 4)detector que los identifica específicamente, enseguida procede a transmitir estas informaciones hasta 5)el sistema de procesamiento datos informatizado, y de este al 6)sistema de registro que lo realiza una impresora acoplada al ordenador(figura 21)(61).



cromatógrafo de gases: (1) Sistema de suministro de gas portador, (2) Manorreductor, (3) Válvula para controlar el flujo de gas portador, (4) Sistema de introducción de la muestra, (5) Sistema de termostatación, (6) Columna, (7) Sistema de detección, y (8) Registrador o integrador.

Figura 21. Cromatógrafo de gases, tomado de VARCARCEL, C.M. (61)

1) Inyector: El sistema de inyección automática de muestras en el sistema cromatográfico, permite un mejor y más eficiente control del procedimiento en lo que se refiere a reproducibilidad y introducción de la muestra en la columna cromatográfica. Existen varias técnicas de inyección automática de la muestra, la split y la splitless, son algunas de ellas, se hará énfasis en la que se utiliza inyección en splitless. Esta técnica de inyección se caracteriza por la entrada total de la muestra vaporizada en la columna, permitiendo el análisis de compuestos de forma exacta en la muestra inyectada. La cantidad de volumen de muestra inyectada con esta técnica splitless es de 2 μL , esto asociado a una adecuada velocidad de inyección asegura la vaporización completa de la muestra a su paso a través de la columna cromatográfica. Una característica indispensable en el análisis es el mantenimiento de una temperatura de inyección constante (condición isotérmica).

La muestra es transferida al inyector splitless por una microjeringa a través de un septo de goma, que tiene por finalidad cerrar la zona de entrada de la muestra evitando la fuga ya sea del gas portador como de la muestra, al mismo tiempo evitar la entrada de oxígeno debido a que podría oxidar a altas temperaturas la fase estacionaria de la columna capilar disminuyendo su vida útil. Es importante recordar de reemplazar el septo periódicamente, debido al desgaste que el mismo sufre en función del uso, ya que partículas de este terminan siendo arrastradas por el gas portador, junto con la

muestra produciendo el efecto "septum bleed". Este efecto consiste en la aparición de una línea base sucia y ocurre pérdida de picos en el cromatograma.

Ocurrida la inyección de la muestra en fase líquida a través del septum a la cámara de vaporización se abre una válvula splitless y se calienta la cámara rápidamente alcanzando una temperatura de inyección de 250°C. La cámara de vaporización consiste en un tubo recto de vidrio tratado que permite que la muestra sea transferida a la columna cromatográfica con la mínima dilución posible con el gas portador. Una vez realizada la inyección en splitless, vaporizada la muestra y arrastrada por la fase móvil existe el fenómeno "efecto solvente" para la focalización de la muestra en la columna capilar para obtener un pico cromatográfico lo más estrecho posible, y consecuentemente con una mayor eficacia (figura 22).

El efecto solvente se denomina a la condensación del disolvente en una pequeña película al comienzo de la columna capilar, permitiendo la reconcentración de los componentes vaporizados de la muestra, siendo particularmente importante que la longitud de esta película de disolvente sea pequeña debido a que la muestra se distribuye a lo largo de ella de manera que a mayor longitud, mayor anchura del pico cromatográfico y consecuentemente menor eficacia. La longitud de la película de disolvente depende de factores como el diámetro de la columna, volumen de muestra inyectado, temperatura del inyector, temperatura inicial de la columna y

afinidad entre el disolvente de la muestra y la fase estacionaria. A mayor diámetro de la columna, mayor la longitud de la película de solvente, como se utilizan columnas de diámetros muy pequeños este factor influye muy poco en la longitud de la película. Por otra parte a mayor volumen de inyección también se producirá un incremento proporcional en la longitud de la película de solvente.

Un aspecto importante es que la temperatura inicial de la columna debe de estar entre 15-20°C por debajo del punto de ebullición del disolvente para permitir la condensación de éste y la formación de esa pequeña película. Si bien, dicha temperatura debe ser mínimo 35°C menor que el componente de la muestra con más bajo punto de ebullición para evitar su condensación. Por otra parte el grado de polaridad del disolvente y de la fase estacionaria de la columna capilar debe ser similar para evitar que la película de solvente sea muy larga y poco homogénea, debido a que esto produciría picos distorsionados en el cromatograma.

La película de disolvente se comporta de forma similar a una fina película de fase estacionaria en la que la muestra vaporizada es altamente retenida debido a su elevada afinidad por el disolvente, con esto se disminuye el diámetro de la columna y origina una pequeña relación de fases, Beta.

Finalmente la formación de la película de disolvente produce una disminución en el diámetro de la columna y una relación de fases Beta pequeña. La disminución de la relación de fases causa un incremento del factor de capacidad, al

aumentar la retención de los solutos y causa un aumento del coeficiente de reparto como consecuencia de la reconcentración de la muestra al comienzo de la columna capilar(64).

2) **El gas portador:** El gas portador o fase móvil del proceso debe ser adecuadamente seleccionado siendo fundamental para obtener un buen rendimiento en la eficacia de la columna. Su función es conducir la mezcla de analitos introducida en el sistema cromatográfico hasta la salida del detector, pasando a través de la columna donde se produce la separación. El gas debe ser químicamente inerte y no interaccionar con la columna, ni con ninguno de los componentes de la mezcla, no afectando el proceso de repartición y separación en la columna. Su elección deberá hacerse en función de la naturaleza de la muestra, de la fase estacionaria y el tipo de detector utilizado, otros aspectos a considerar es el coste, pureza y seguridad de su uso. El gas portador debe ser de elevada pureza, libre de cualquier contaminante que pueda afectar la fase estacionaria.

Algunas características más destacadas de los principales gases son: el nitrógeno es seguro y económico, pero presenta baja conductividad térmica. Ya el hidrógeno presenta elevada conductividad térmica, baja viscosidad y es de bajo costo, pero tiene la desventaja de reducir o alterar los analitos de la muestra. El helio es seguro de manipular, tiene alta conductividad térmica, es de baja viscosidad, y es menos denso que el hidrógeno, lo que le permite un mayor

caudal. Su desventaja es el elevado costo.

La fase móvil en Cromatografía a Gas (GC) afecta la duración del proceso cromatográfico y a la resolución cromatográfica a través de la velocidad de los analitos en el gas. De este modo cuanto menor sea la difusión del analito, menor es la velocidad óptima del gas, aumentando la duración del análisis.

La resolución cromatográfica depende del gas portador, ya que este influye en la eficacia de la columna. La eficacia de una columna en la separación de un componente depende de la anchura del pico cromatográfico, que a su vez se evalúa comparando el número de platos teóricos de la columna con el número de platos efectivos.

La naturaleza del gas portador afecta el número de platos teóricos a la altura equivalente a un plato y en consecuencia a la eficacia de la columna. Para elegir el gas portador y determinar el flujo óptimo de éste a través de la columna manteniendo la mayor eficacia posible, se utiliza la ecuación de Van Deemter(61).

$$H = A + B/u + (C_M + C_S)u$$

La ecuación considera las turbulencias del gas portador, su difusión y la resistencia a la transferencia de masa. Si enfrentamos el H frente a la velocidad lineal media de cada posible gas (nitrógeno, helio, y hidrógeno) obtendremos distintos gráficos como las representadas en la figura 23.

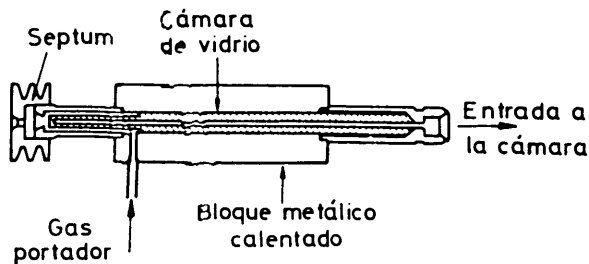


Figura 22. Bloque de inyección. Tomado de Técnicas Analíticas de Separación(61).

En virtud de las características intrínsecas de cada gas el H₂ en teoría permite alcanzar mayores velocidades sin disminuir la eficacia de la columna, no obstante debido al riesgo de explosión que representa se torna extremadamente peligroso la recomendación para su utilización. Por otra parte el gas nitrógeno causa pérdida de eficacia en la columna relacionada con pequeños aumentos en la velocidad del gas. Debido a esto el helio se torna la alternativa más idónea y viable como gas portador, ya que permite mantener una óptima eficacia frente a una velocidad de gas adecuada para el análisis, además su manejo no representa ningún riesgo al operador.

3) **Columna cromatográfica:** La fase estacionaria que se encuentra en la columna capilar de fenil-metil-silicona es líquida y está confinada en un tubo largo metálico, que se encuentra fija a esta a través de enlaces iónicos covalentes a la superficie interna, formando una capa delgada. La ventaja del uso de estas columnas capilares es que confieren al análisis mayor resolución, sensibilidad y velocidad, utilizando un mínimo de muestra del orden de 2 uL.

Al elegir una columna cromatográfica debe hacerse en función del tipo de análisis a realizar, tomando en cuenta la fase estacionaria, espesor de la fase, longitud de la columna y diámetro interno de la misma.

En el caso del análisis y detección de drogas de abuso, debido a que los metabolitos de las drogas a analizar son compuestos apolares, utilizamos fases apolares para su análisis cromatográfico. Estas fases apolares de la columna cromatográfica tienen por finalidad separar solutos en orden creciente a sus puntos de ebullición, alcanzando elevados rendimientos, con la ventaja de ser muy resistentes al oxígeno y a la temperatura, lo que les confiere una vida media amplia.

Se puede relacionar los parámetro diámetro interno y espesor de la columna cromatográfica a través de la siguiente ecuación:

$$B = D/4u$$

Donde B(beta) es la relación de fases, D es el diámetro interno de la columna en micras y u es el espesor de la fase estacionaria. Observando estos aspectos, alteraciones en el

espesor de la fase estacionaria o bien en el diámetro interno de la columna cromatografica influyen directamente en la retención de los solutos de la muestra. Si bien, columnas cromatográficas con espesores de la fase estacionaria elevados, presentan relaciones de fase pequeñas, lo que implica en mayor retención de solutos y deberán ser utilizados para análisis particularmente de compuestos muy volátiles, con la ventaja adicional que la capacidad de carga de la columna aumenta(64). Se presenta en la tabla 8 algunos ejemplos de fases estacionarias.

Por otra parte, si los espesores de fase de las columnas cromatográficas son bajos, se utilizarán estas columnas para separar compuestos poco volátiles.

En columnas capilares el diámetro interno oscila entre 0.18-0.25 mm, el espesor de la fase entre 0.2-0.5 μ . Elegir una longitud adecuada de la columna estará en función de la complejidad del análisis de la muestra y en el caso del análisis de metabolitos de drogas de abuso dependerá también de la proximidad entre los puntos de ebullición de los compuestos a separar. Una mejor y mayor resolución en la separación entre los picos cromatográficos de los distintos compuestos de la mezcla de una muestra, será alcanzada cuanto mayor sea la longitud de la columna, debido a que a mayor longitud, mayor número de platos teóricos. La longitud de las columnas capilares oscila entre 10 y 30 metros.

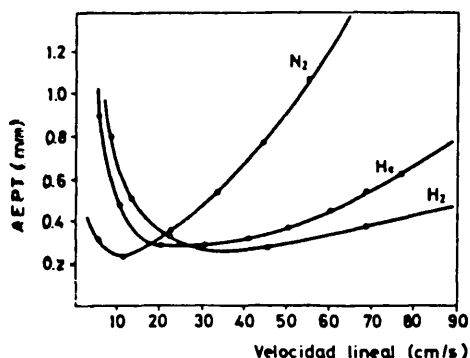


Figura 23. Variación de la H con la velocidad de flujo de la fase móvil (N₂, He, H₂) en columna capilar. Tomado de Técnicas Analíticas de Separación(61).

4) **Detector:** El detector es un dispositivo capaz de medir una propiedad física del gas portador, que varía con la presencia de pequeñas cantidades de los componentes que se analizan en una muestra. Consiste en un sistema continuo de detección por el que pasa el gas portador con los analitos separados previamente en la columna cromatográfica y genera una señal eléctrica distinta para cada analito en la muestra, que es amplificada y enviada al registrador o microprocesador. Una característica del detector es su elevada sensibilidad, que se expresa por la razón existente entre la señal obtenida (respuesta del detector), frente a la concentración del analito o velocidad de flujo.

Para los detectores que dependen de la concentración, la sensibilidad viene definida por el producto del área del pico (A) por la velocidad de flujo (v), dividido por el peso de muestra (p): $S = A.v.t/p$

Para detectores que dependen de la masa, la sensibilidad

es el cociente entre el área del pico y el peso de muestra, no dependiendo de la velocidad de flujo. Siendo el límite de sensibilidad, la magnitud de la propiedad física que proporciona la mínima señal perceptible.

El detector es un elo entre la separación de los componentes de una muestra en una mezcla que pasa por la columna y el cromatograma. La detección del analito genera un potencial eléctrico, señal esta que es transmitida a un registro, el cual diseña los respectivos cromatogramas.

La estabilidad del detector depende de la constancia de la señal de fondo obtenida en función del tiempo. La respuesta del detector debe ser continua y reproducible frente al mayor número posible de sustancias. Debe poseer un rango de concentraciones de soluto en el que la respuesta del detector sea lineal, bien sea que aumentos de la cantidad de soluto correspondan a un incremento proporcional de la señal del detector, siendo la señal del detector directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra.

El ruido de fondo del detector determina el límite de detección: cantidad mínima de analito que puede ser detectada. Otras características del detector debe tener tiempo de respuesta corto, resistencia mecánica y química y ser de fácil manejo y mantenimiento (61).

Existe un amplio número de detectores usados en cromatografía de gases como son: de Ionización de llama, de Captura electrónica, de Conductividad térmica, de Nitrógeno-fósforo, de espectrometría de masa, siendo este último de

caracter universal, debido que es capaz de producir una señal eléctrica frente a cualquier tipo de sustancia que eluya en la columna. Se representa a seguir el procedimiento analítico de inyección en Cromatografía a Gas (GC).

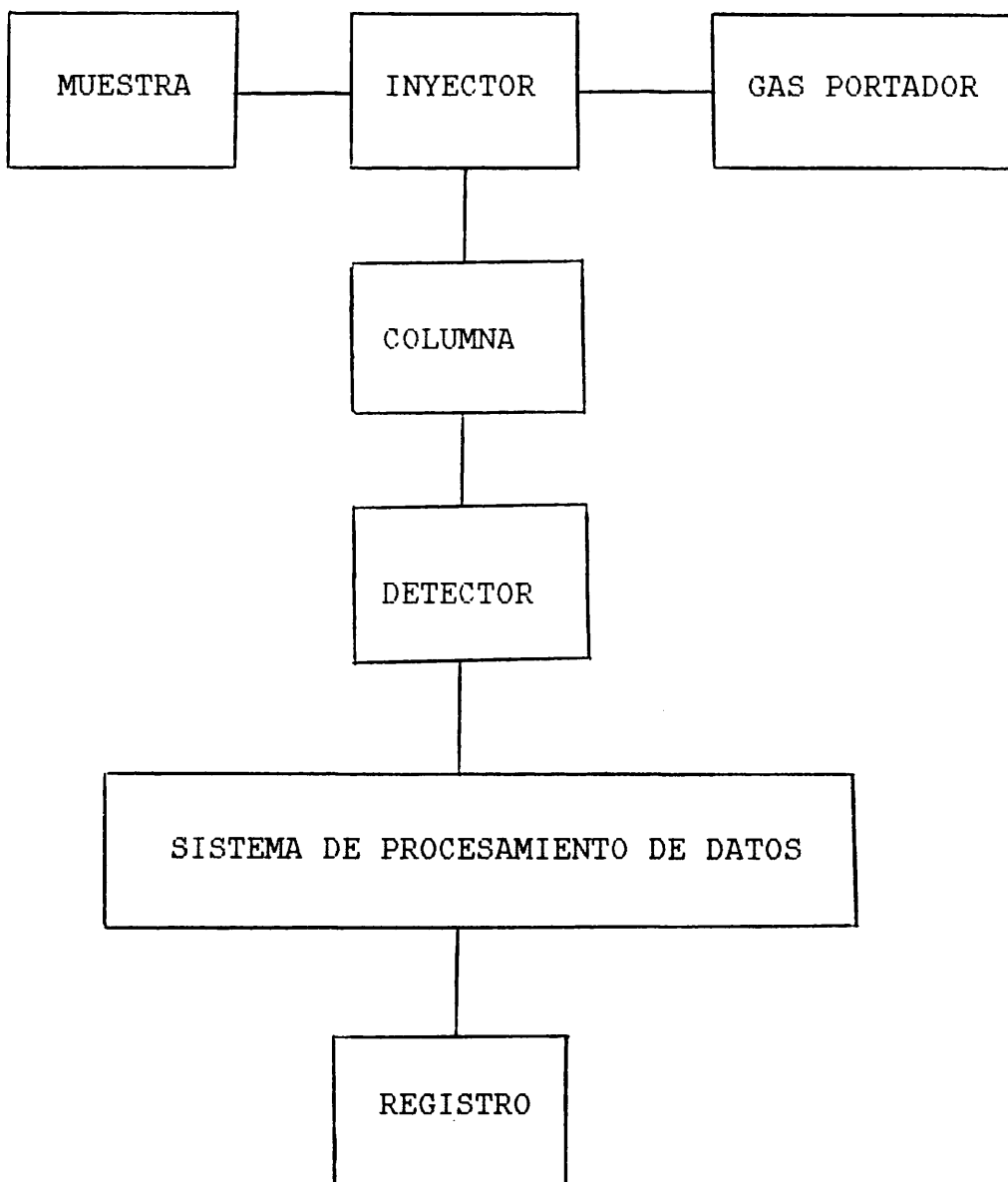


Figura 24. Esquema del procedimiento analítico

9.2.- Aplicación en Muestras Biológicas de orina

La muestra biológica utilizada en este trabajo fue la orina de los pacientes, que una vez determinado e identificado el metabolito por un método de inmunoensayo preliminar, se procedió a su confirmación por Cromatografía de Gases/Espectrometría de masa(18).

9.3.- Determinación de Drogas de Abuso en orina

Fueron separados e identificados metabolitos de opiáceos(morfina,codeína,6-MAM), delta-9-tetrahidrocannabinol, cocaína(benzoylecgonina,ecgonina metilester), en muestras de orina en poblaciones laboral y drogodependientes.

Stationary Phase	Max. Temp °C	Phase Type	Uses
Apiezon L	300	Hydrocarbon grease	Barbiturates Amphetamines
SE-30	300	Dimethyl-silicone	General purpose
OV-1	350	Dimethyl-silicone	General purpose
OV-101	350	Dimethyl-silicone	General purpose
OV-17	350	Phenylmethyl-silicone	General purpose
Carbowax 20M	225	Polyethylene glycol	Alcohols

Tabla 8. Ejemplos de fases estacionarias usadas en análisis de drogas de abuso. Tomada de The Analysis of Drugs of Abuse an Instruction Manual (1).

10.- MÉTODO ESPECTROMÉTRICO (MS)

10.- Método Espectrométrico

10.1.- Descripción de la Técnica

Los principios de la técnica espectrométrica se fundamentan en la correlación entre la estructura molecular y el tipo de fragmentación iónica. Existe una correlación directa entre la estructura química y el tipo de fragmentación de masas que caracteriza el compuesto analizado como una huella química. Para la identificación de las drogas de abuso y sus metabolitos, se utiliza la Espectrometría de masas a partir del impacto de electrones sobre la sustancia consiguiéndose su fragmentación molecular. La espectrometría de masa se basa en la ionización de las muestras en estado gaseoso y en la separación de las moléculas que la componen, según una relación masa/carga de los iones formados.

El espectro de masas se compone de dos elementos la fuente iónica y el analizador fundamentalmente, en la primera las moléculas son convertidas a iones positivos y otras con cargas neutras. Los iones moleculares una vez fragmentados pasan por un campo magnético intenso, el cual desvía los iones positivos por un tubo curvo conforme a su relación de masa/carga (m/z), siendo separados por el espectrómetro que los envía al detector, el cual registra picos con las relaciones m/z encontradas. Como el número de carga suele ser uno, los picos de relación m/z se resumen a la masa del ión que se trate. En el analizador es donde se produce la

diferenciación de los iones en relación a la m/z .

El espectro de masa de un compuesto se presenta como una gráfica de barras cuyo eje de las abscisas presenta unidades de masa (valores m/z) y el eje de las ordenadas presenta intensidades relativas expresadas en número de iones de una relación masa/carga dada que llega al detector. Al pico base considerado el más alto se le asigna de forma arbitraria una intensidad del 100%. Es importante recordar que existen excepciones en que los compuestos no presentan un ión molecular en su espectro de masa, aunque suele ser fácil de identificar por su amplia abundancia(65).

Cuando se inyecta una muestra en el cromatógrafo de gases, la sustancia en estudio es arrastrada en su totalidad (splitless) dispersándose en el gas portador, que es introducido dentro de la fuente iónica del espectrómetro a través de la interfase Gases/Masas. Los electrones actúan bombardeando las moléculas de la muestra, como proyectiles expulsados de la fuente iónica por un filamento incandescente atravesando enseguida la cámara iónica en dirección a un ánodo. De este modo el flujo de moléculas procedente de la muestra vaporizada que entra en contacto con la fuente iónica interactúa con el haz de electrones ionizando las moléculas y formando los iones positivos. Estos salen de la fuente iónica por un potencial siendo acelerados por el gran diferencial de potencial existente entre los dos electrodos (figura 25).

Acto seguido al flujo de iones positivos que pasan por entre las placas de repulsión al salir de la fuente iónica se

les aplica potenciales bajos para que se produzca un haz definido de iones positivos y se enfoca el rayo de luz en un espectrofotómetro(66).

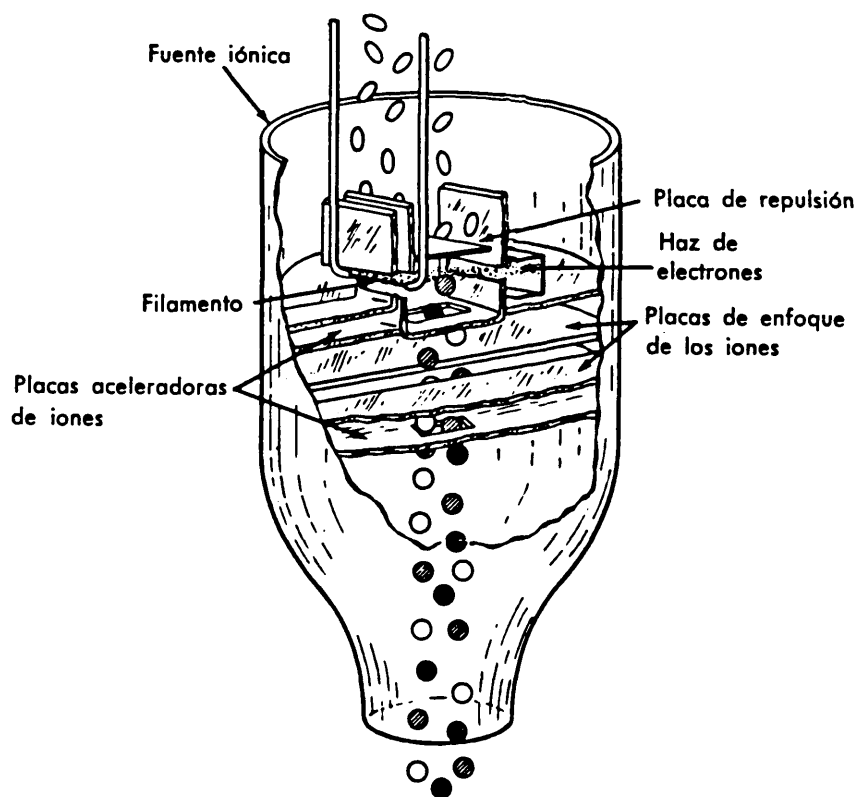


Figura 25. Fuente iónica. Tomada de Interpretación de los Espectros de Masas (66).

El haz iónico que se deriva de la fuente iónica impactando en las moléculas de la muestra, las divide en sus respectivas masas iónicas (m/z), y a través de deflexión magnética ocurre la separación de los iones positivos, que colisionan con un colector de iones produciendo una corriente de electrones que es proporcional a la abundancia iónica (figura 26).

La eficacia de la ionización de las moléculas y la formación del espectro es de extrema sensibilidad(67), siendo capaz de obtenerse espectros patiendo de submicrogramos de muestra.

Los compuestos de baja volatilidad pueden ser introducidos insertados directamente, mientras que otros es necesario utilizar un procedimiento de derivatización previa. Una pequeña fracción de la sustancia evaporada es ionizada por bombardeo de electrones en condiciones de elevado vacío en la fuente iónica, resultando en la descomposición molecular de la sustancia con sus respectivos pesos moleculares definidos en fragmentos iónicos. Todos los iones positivos son acelerados, focalizados y separados de acuerdo con su relación masa/carga(m/z), en el campo magnético que sigue a su paso tras el bombardeo con el haz de electrones, siendo medida la corriente de cada ion separado. Es de extrema importancia relacionar los iones positivos formados de la muestra con el bombardeo de electrones indicado por el espectro de masa, con la estructura molecular de la muestra.

El Espectro de Masas representa la relación entre la

proporción masa/carga de la variedad de fragmentos iónicos formados y la intensidad relativa de la corriente iónica. Lo que ocurre es que los electrones tienen energías del orden de 50-100V muy superiores a las energías necesarias para la ionización de las moléculas que es del orden de 7-16V. De esto resulta que de la interacción de un electrón y una molécula surge un ión molecular por eyección de otro electrón. El ión molecular a su vez se descompone en fragmentos iónicos del espectro, que indican las partes que componen la molécula.

La interpretación del espectro de masas se fundamenta en la identificación del ión molecular que determina el peso molecular y la composición elemental de una molécula(66). Un espectro de masa manifiesta esencialmente la masa de la molécula y los fragmentos que se originan de su ruptura.

El Espectro de Masas es usualmente representado graficamente por abscisas y ordenadas donde las abscisas corresponden a la proporción masa/carga en unidades de masa atómica(AMU) y las ordenadas representa la intensidad relativa de la corriente iónica de la variedad de fragmentos iónicos formados.

El tipo de fragmentación es reproducible y característico para cada compuesto orgánico. De esta forma la Espectrometría de Masas es el método más específico en la actualidad para la identificación de compuestos orgánicos. El elevado poder de resolución de la cromatografía de gases combinado con columnas capilares y la técnica espectrométrica permite alcanzar resultados prácticamente definitivos en

cuanto a la identificación y elucidación estructural de los analitos(61).

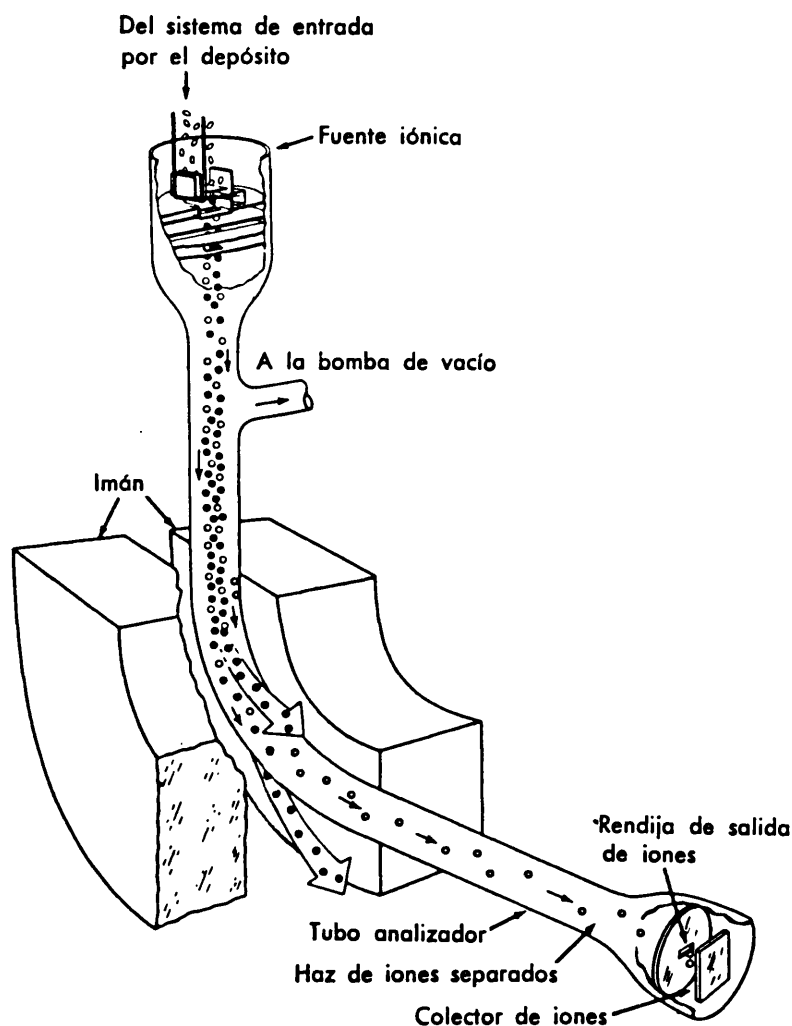


Figura 26. Representación esquemática de un Espectro de Masas. Tomado de MCLAFFERTY, F.W. (66)

La correlación entre estructura química y fragmentación iónica derivada de la ionización de la sustancia es el pilar

de identificación en que se basa esta técnica. Todo compuesto orgánico tiene un tipo fundamental estructural correlacionado a sus fragmentos iónicos, cuyo cálculo puede obtenerse con exactitud por la medida de su masa o PM(peso molecular), esto se aplica para las drogas y sus metabolitos. Es por tanto un método de singular importancia, imprescindible y de extrema utilidad y fiabilidad para identificación de drogas de abuso a partir del hallazgo de la masa molecular(68) (tabla 9).

Los metabolitos usualmente poseen la misma estructura química fundamental que su pariente compuesto de origen y además su Espectro de Masa contiene similares o idénticas moléculas y consecuentemente tendrá semejantes fragmentos iónicos al descomponerse en la fuente iónica(1).

Los cambios químicos de la estructura fundamental y los consecuentes al metabolismo de la sustancia o debido a los procedimientos de derivatización, conducen a los típicos cambios en el Espectro de Masas. No se puede considerar una identificación química precisa sin haber sido capaz de detectar su presencia particularmente de drogas en fluidos o materiales biológicos y su respectiva confirmación por Gases Masas.(figura 27)

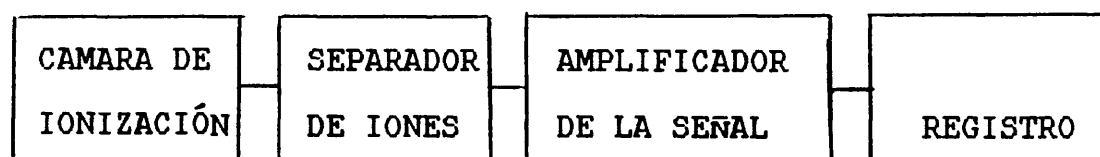


Figura 27. Proceso Espectrométrico de Masas

Trace	Immunomethod	Method(s) of comparison	Results	Reference
cortisol	ria	hplc or ms (reference method)	hplc more accurate than ria	1068
cortisol	ria	ms	ria results 25% higher than ms	1069
6 β -hydroxycortisol	ria	hplc	good correlation. ria simple, rapid	1070
derivative of prostaglandin E ₂	ria	gc-ms, tlc	ria least specific	1071
benzodiazepines	EMIT	tlc	EMIT faster than tlc	1072
benzodiazepines	EMIT	gc	EMIT frequently gives low values for elevated diazepine concentrations	1073
diazepam	ria	gc	ria consistently higher by about 60 ng/ml	1074
diazepam	EMIT	gc	good agreement	1075
bupropion	ria	hplc	excellent agreement	1076
doxepin	ria	hplc	good correlation ($r = 0.99$)	1077
haloperidol	ria	gc	good agreement only after extraction before ria determination	1078
imipramine	ria	gc, gc-ms	results of all 3 methods agree	1079
nomifensine	ria	gc	results agree	1080
procainamide	EMIT	hplc	results agree ($r = 0.98$)	1081
procainamide	ria	gc	good correlation	1082
phenacyclidine	ria	gc, EMIT	correlation between 3 methods acceptable	1083
phenacyclidine	EMIT	gc	correlation good ($r = 0.98$)	1084
phenobarbitone, phenytoin	EMIT	hplc	correlation ($r = 0.99$ and 0.97)	1085
methotrexate	ria	hplc, EMIT	agreement	1086
gentamycin	ria	hplc, fluoresc. immunoassay	fluorescence immunoassay gives best results	1087
gentamycin	ria	EMIT, microbiological assay, adenylation	ria gives higher results, other methods agree	1088
indol-3-ylacetic acid	ria	gc-ms	agreement after chromatography before ria	1089
cannabinoids	EMIT	ria, gc-ms	EMIT preferable to ria or gc	1090
Δ^9 -tetrahydrocannabinol	ria	gc-ms	results agree	1091
tobramycin	EMIT	microbiol. assay	results agree	1092
tobramycin	ria	EMIT, microbiol. assay	EMIT more precise	1093
drugs of abuse	EMIT	gc-ms	excellent agreement in most cases	1094
morphine	ria	gc	ria gives higher results	1095
morphine	EMIT	gc	gc more precise	1096
quinidine	EMIT	fluorimetry	EMIT more specific	1097
quinidine	EMIT	hplc	EMIT gives higher results, hplc more specific	1098
quinidine	EMIT	hplc	hplc more specific, correlation $r = 0.95$	1099

Tabla 9. Comparación de métodos de inmunoensayos.

Tomado de Organic Trace Analysis(68)

10.2.- Aplicación en Muestras biológicas de orina

El método espectrométrico de masas se aplicó para la confirmación de muestras de orina positivas en técnicas de

screening por inmunoensayos de población laboral de nuevo ingreso y de plantilla, así como también en población de pacientes en rehabilitación de drogodependencia.

10.3.- Determinación de drogas de abuso en orina

Una vez constatada la positividad de las muestras a drogas de abuso por las tres técnicas de screening por inmunoensayo, se procede a su confirmación por Gases Masas. En el presente trabajo fueron identificados opiáceos (morfina, 6-MAM, codeína), cannabis (delta-9-tetrahidrocannabinol), cocaína, benzoylecgonina, ecgonina-metil-ester).

10.4.- Cromatogramas y Espectros de masas de las drogas de abuso

A seguir mostramos ilustraciones de los cromatogramas de los metabolitos de drogas de abuso (marcadores biológicos) investigados, con sus respectivos espectros de masas. Para opiáceos: morfina (figura 28), codeína (figura 29) y 6-MAM (figura 30). Para el cannabis delta-9-tetrahidrocannabinol (figura 31). Para cocaína (figura 32), benzoylecgonina (figura 33) y ecgonina metilester (figura 34).

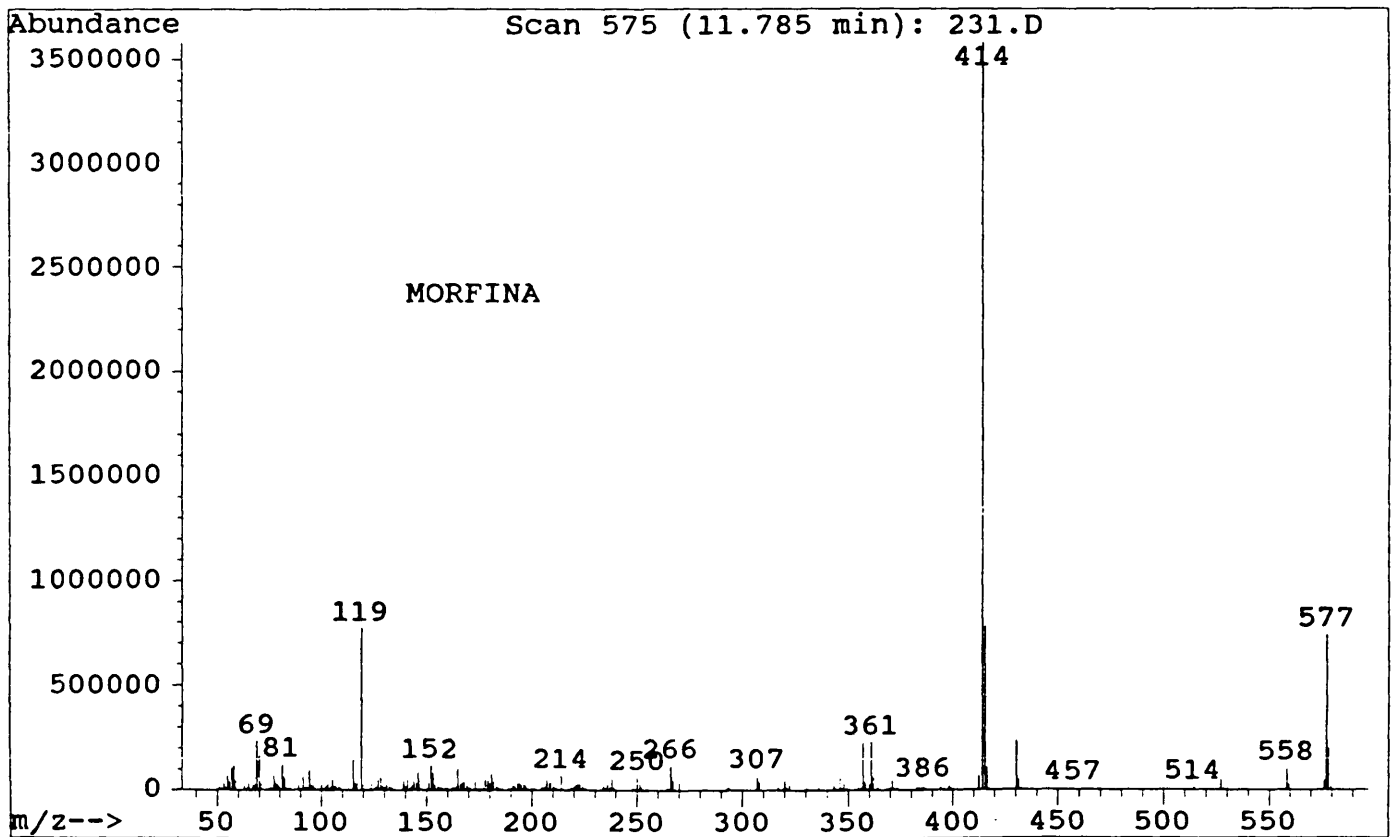
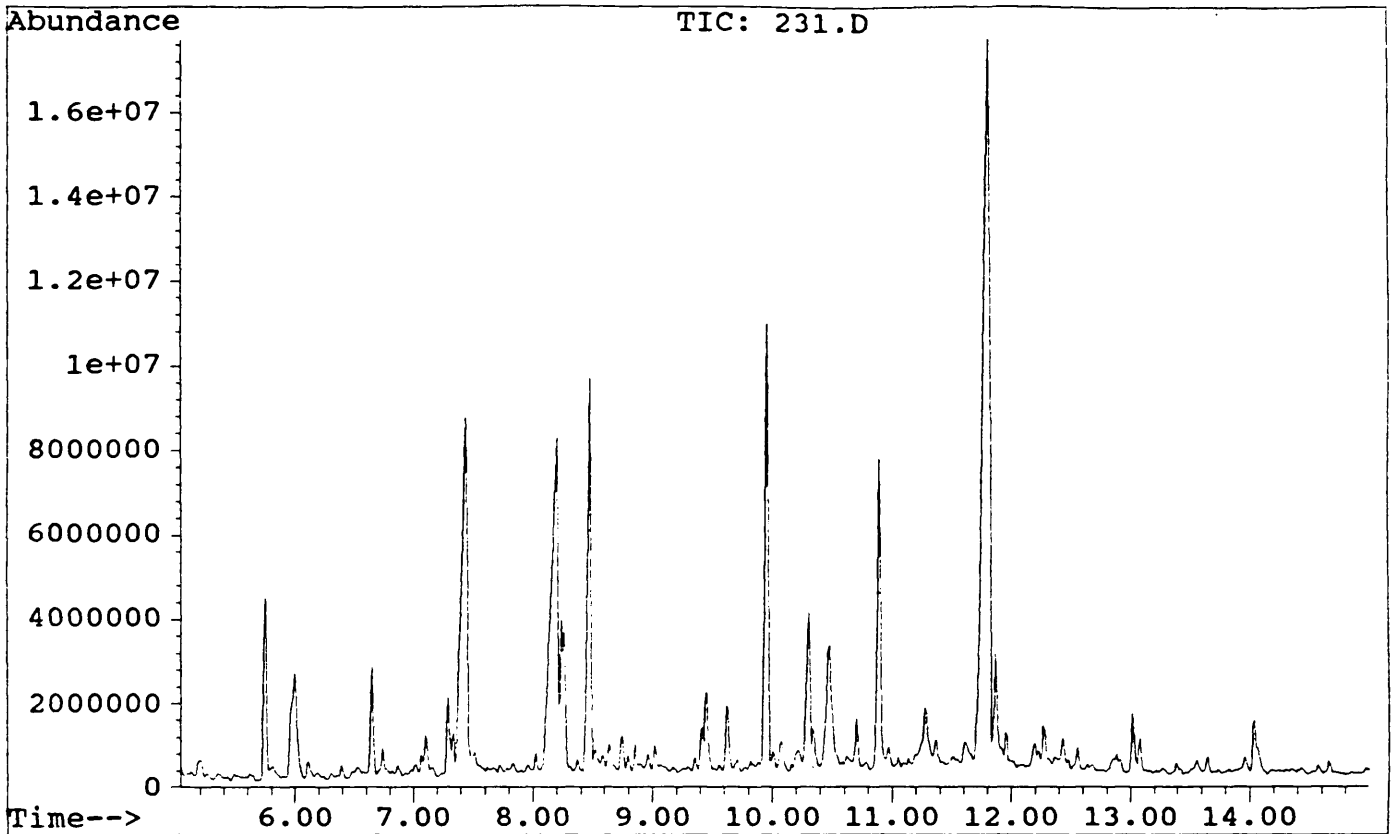


Figura 28. Cromatograma y Espectro de masas de la morfina

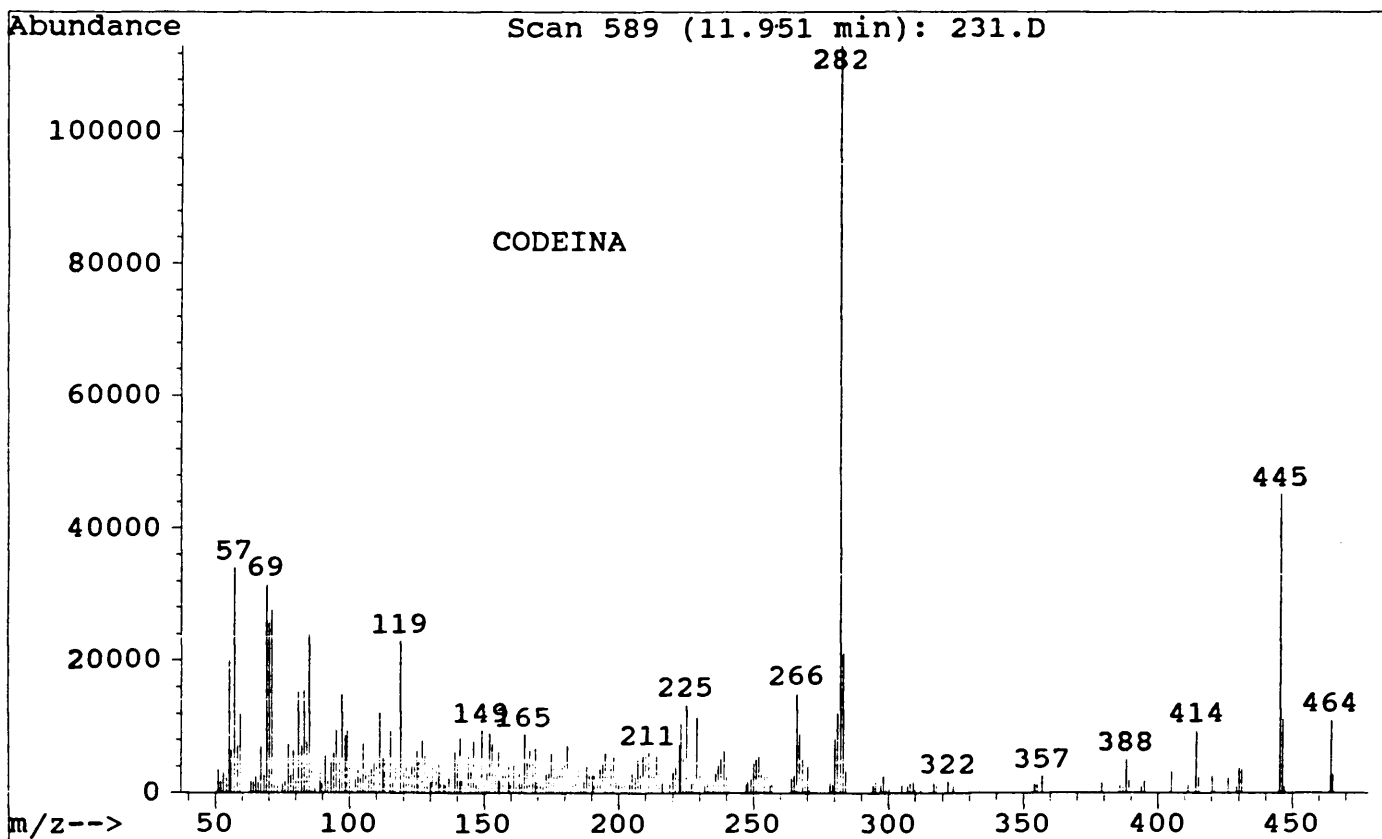
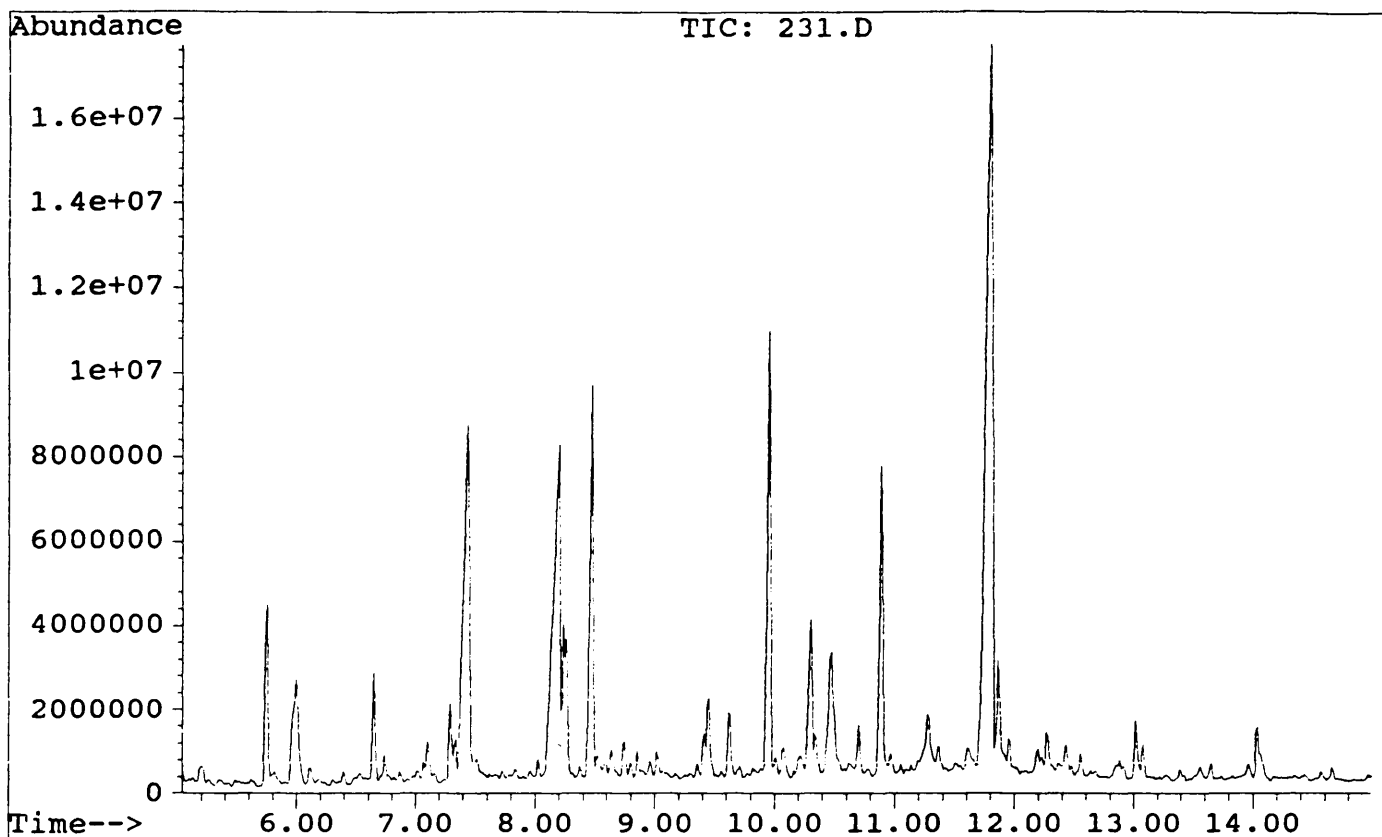


Figura 29. Cromatograma y Espectro de masas de la codeina

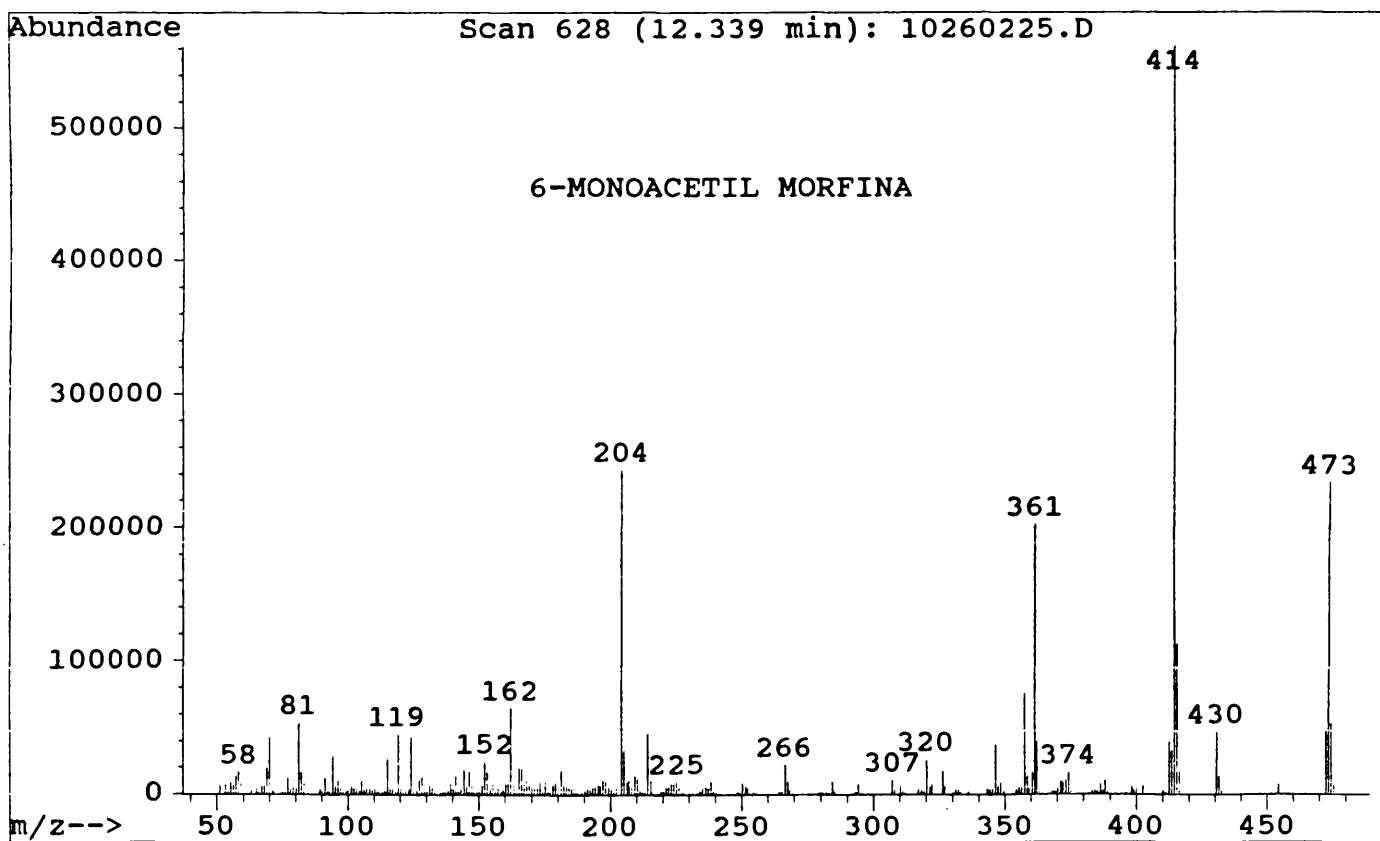
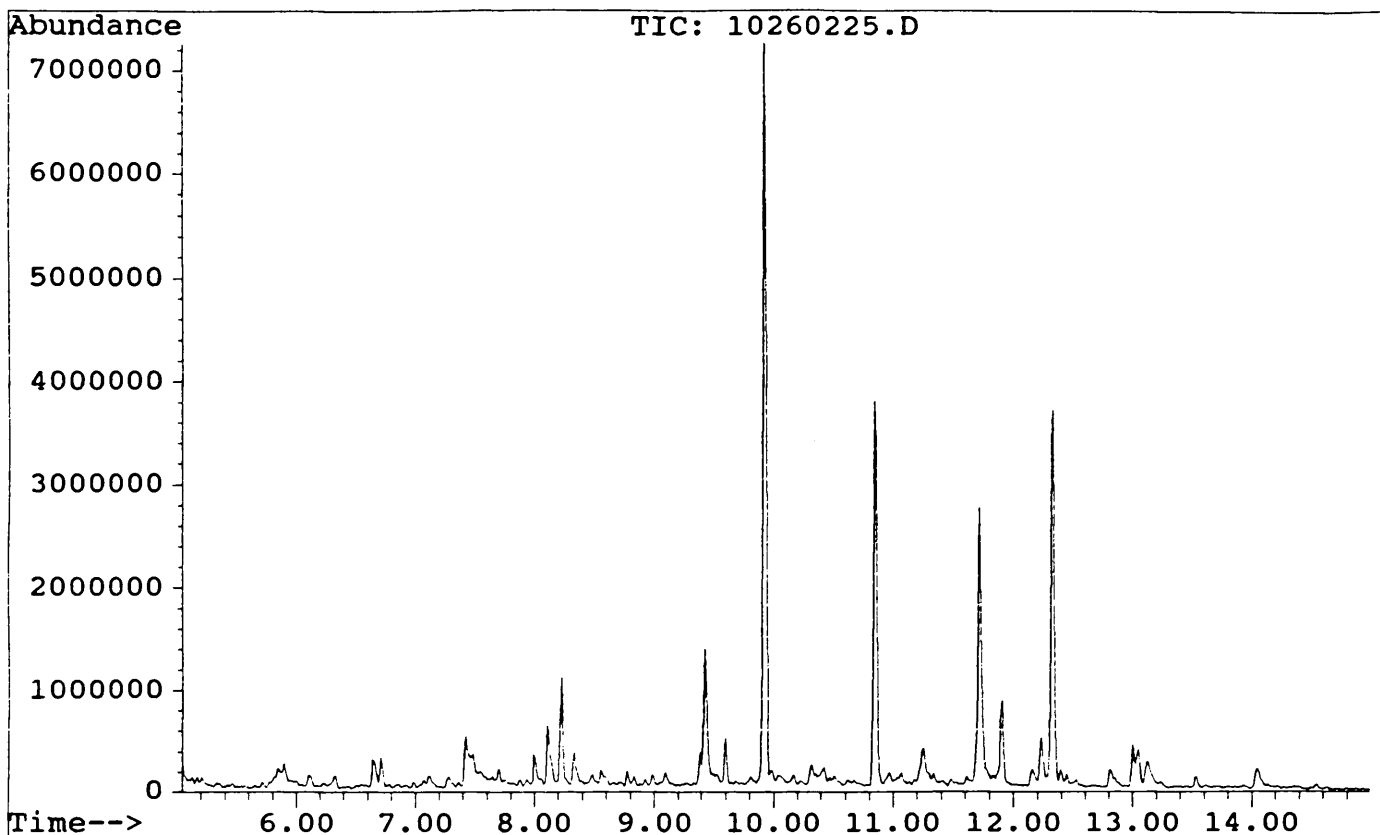


Figura 30. Cromatograma y Espectro de masas de 6-MAM

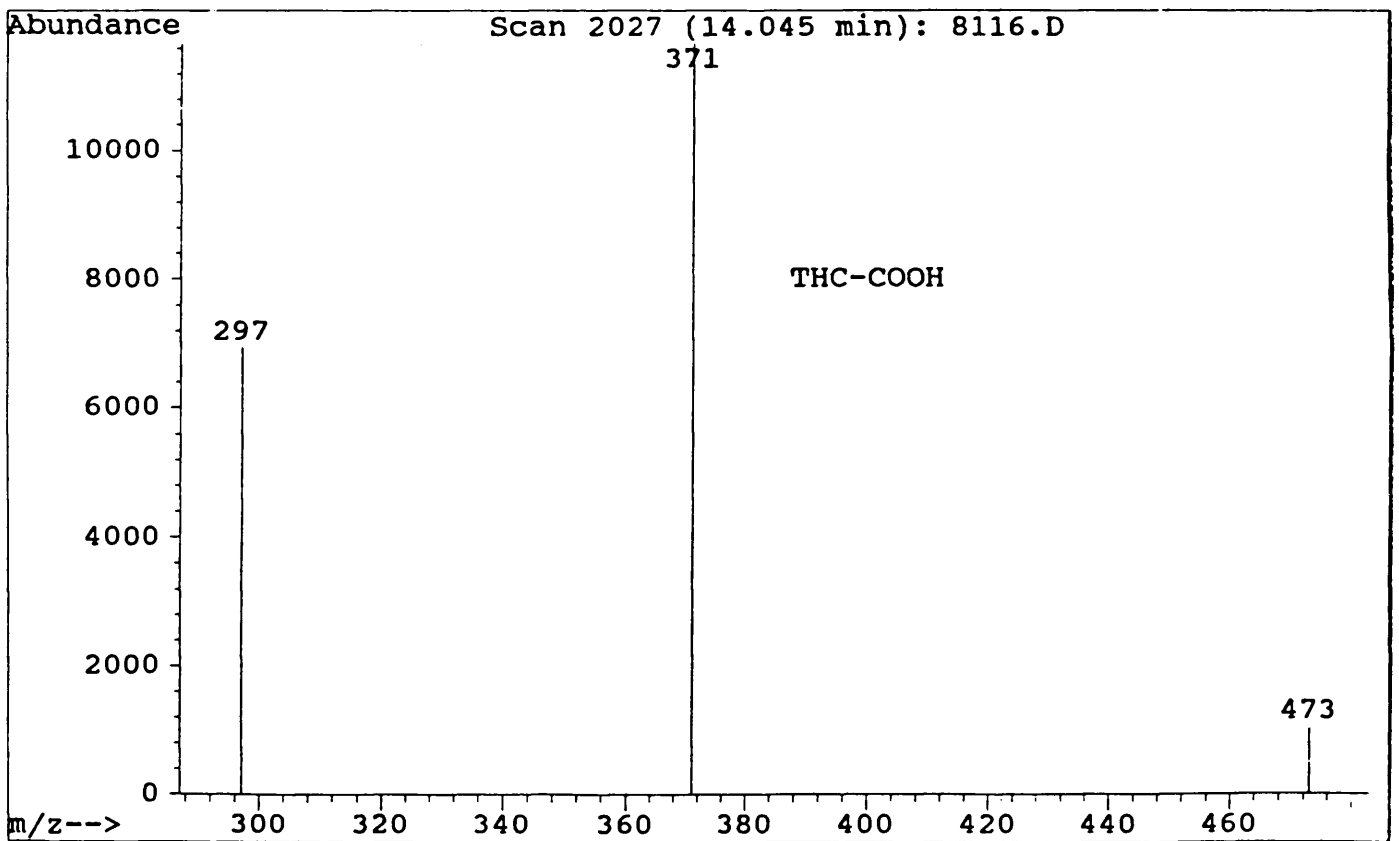
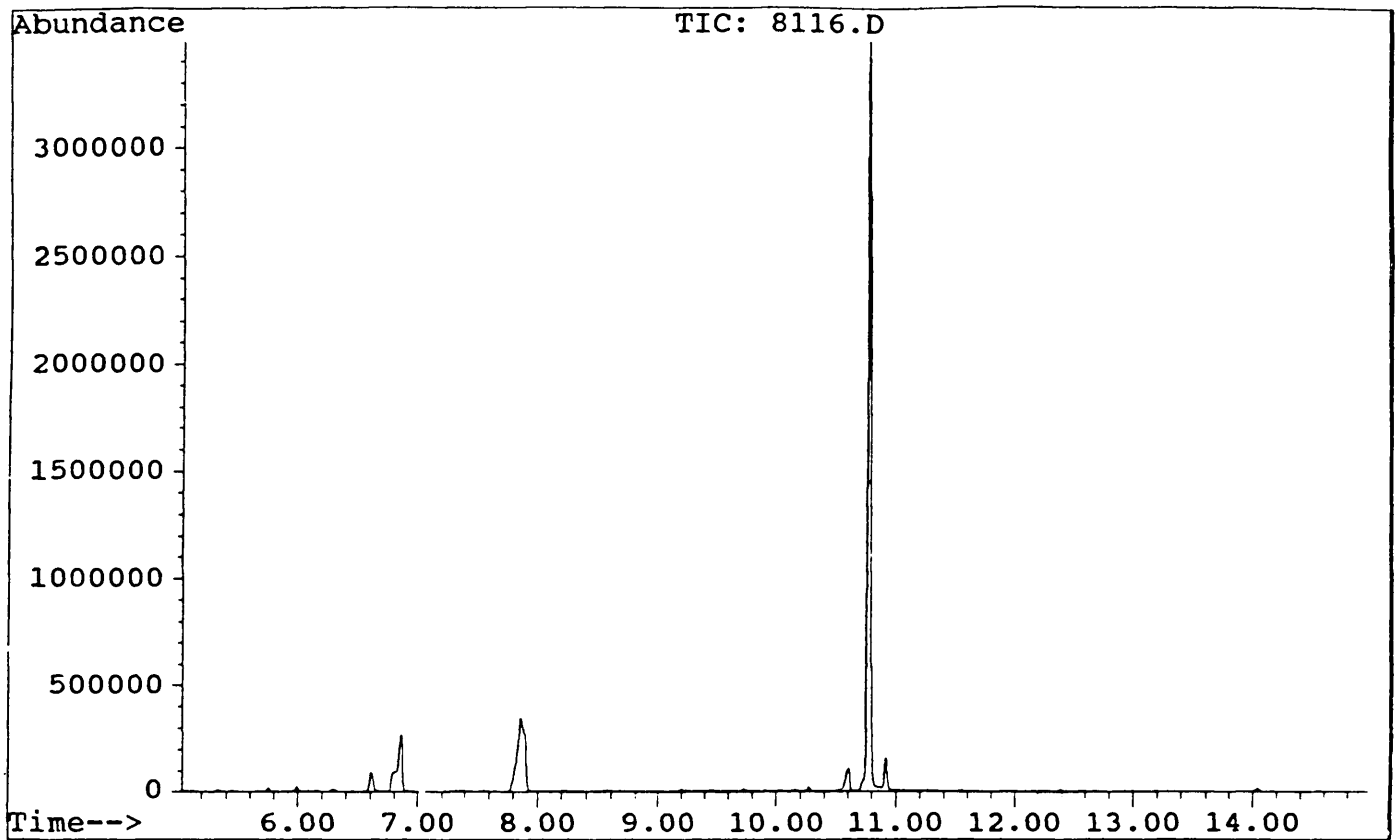


Figura 31. Cromatograma y Espectro de masas del cannabis

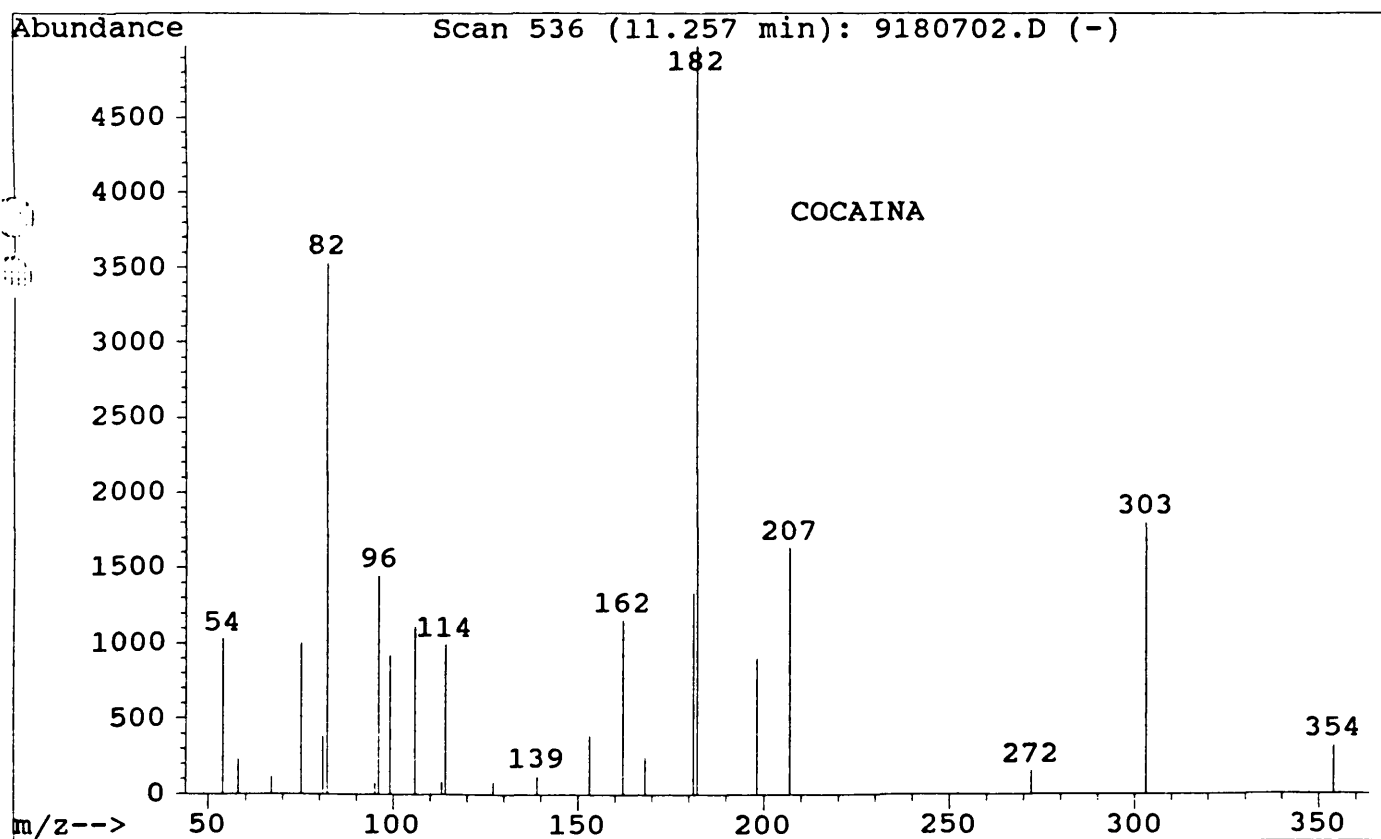
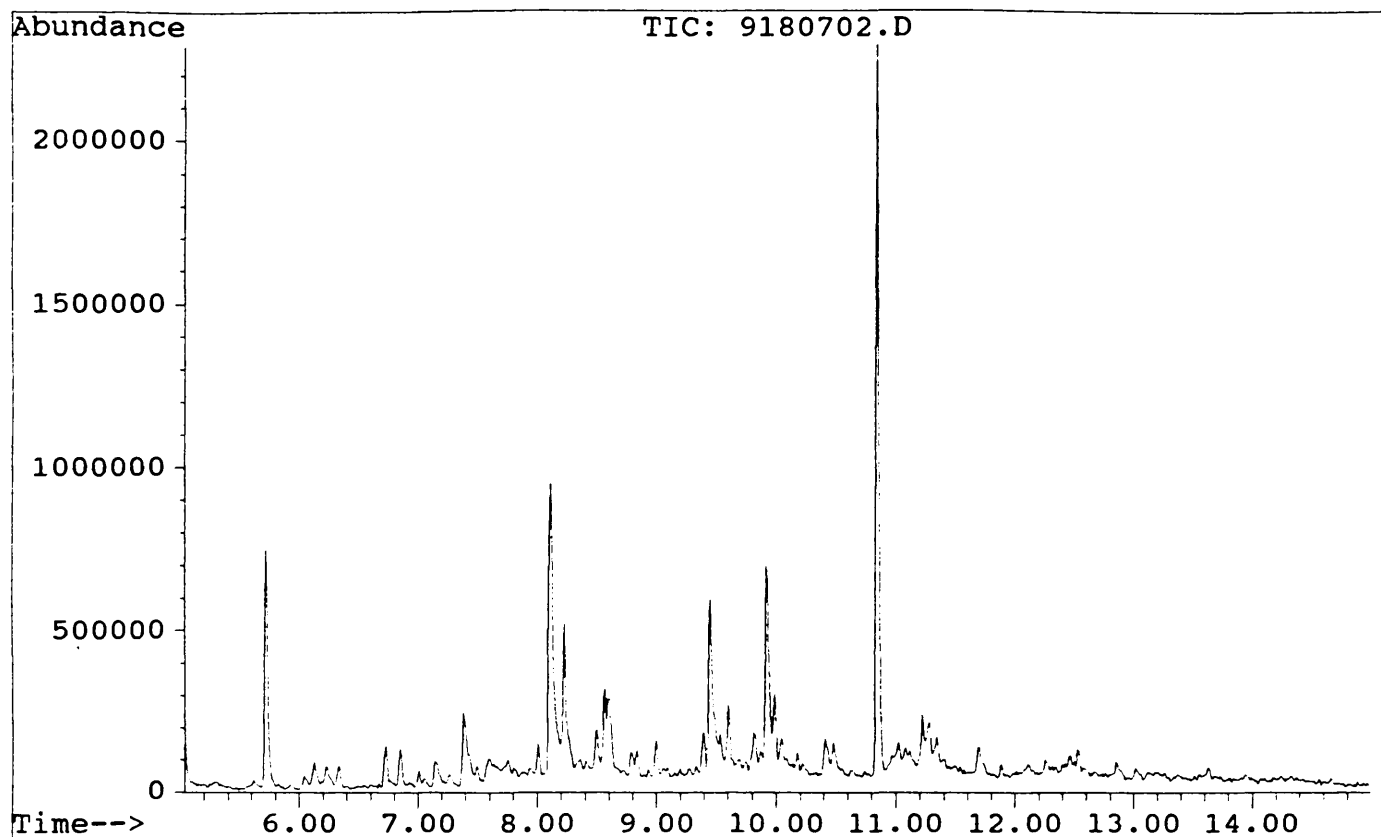


Figura 32. Cromatograma y Espectro de masas de la cocaína

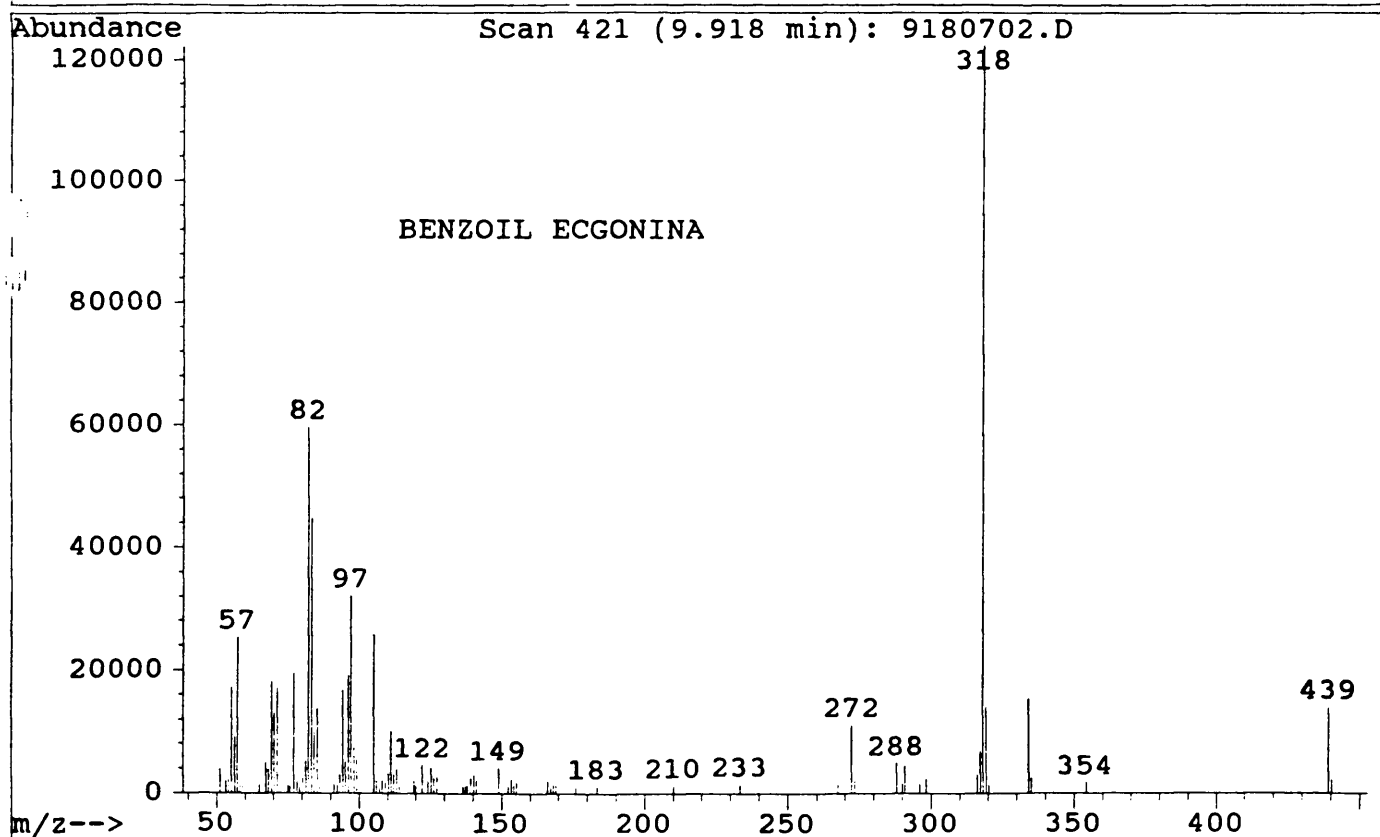
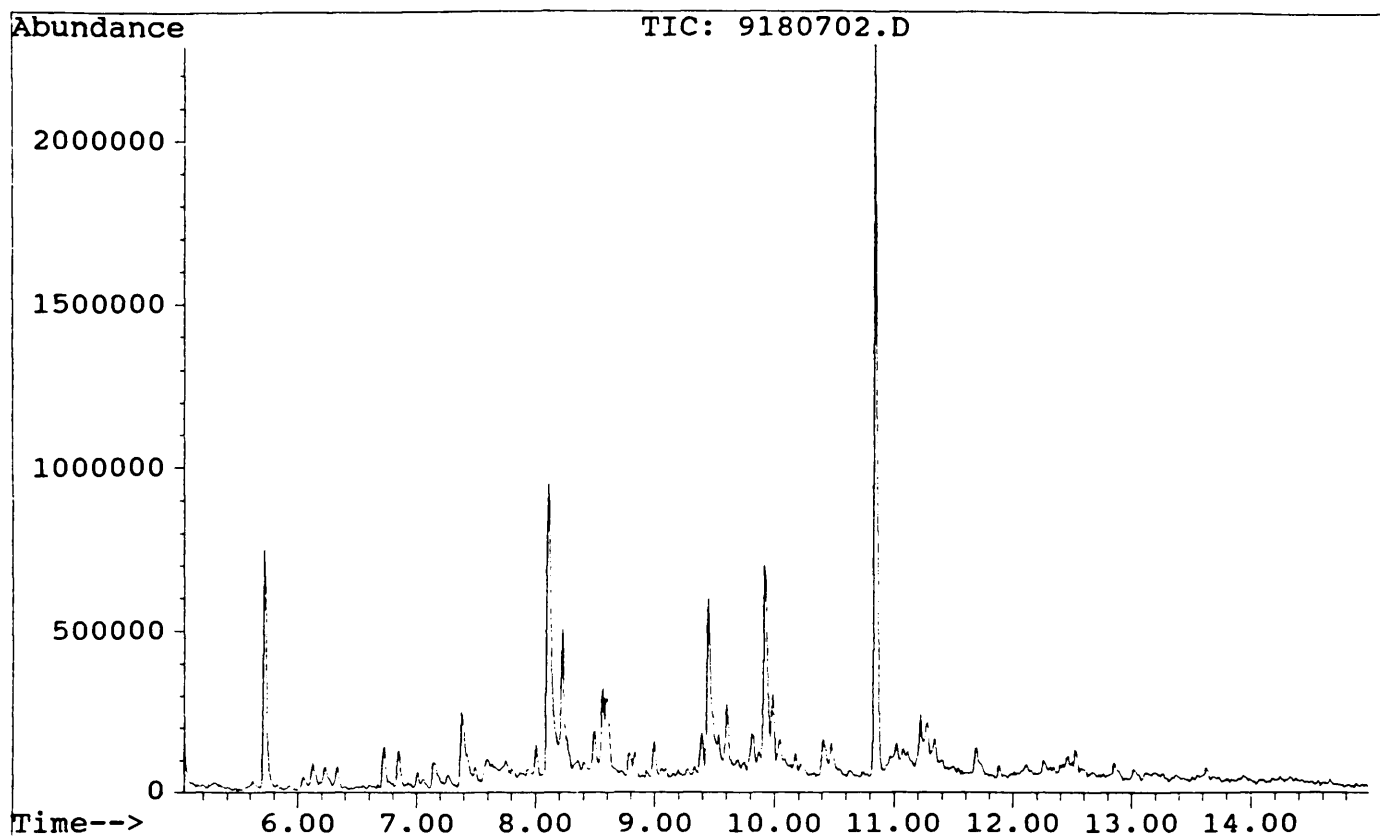


Figura 33. Cromatograma y Espectro de masas de la benzoylecgonina(BZE)

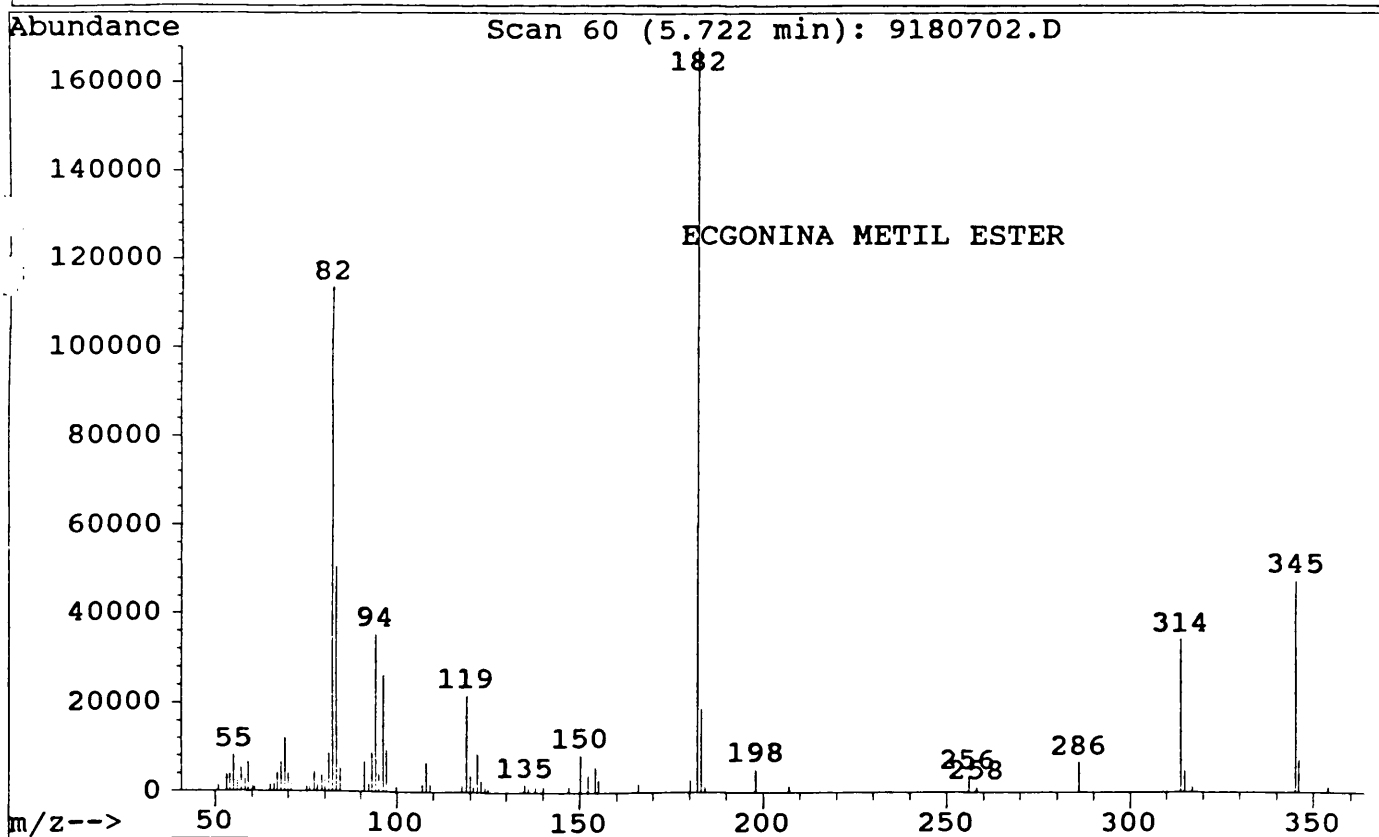
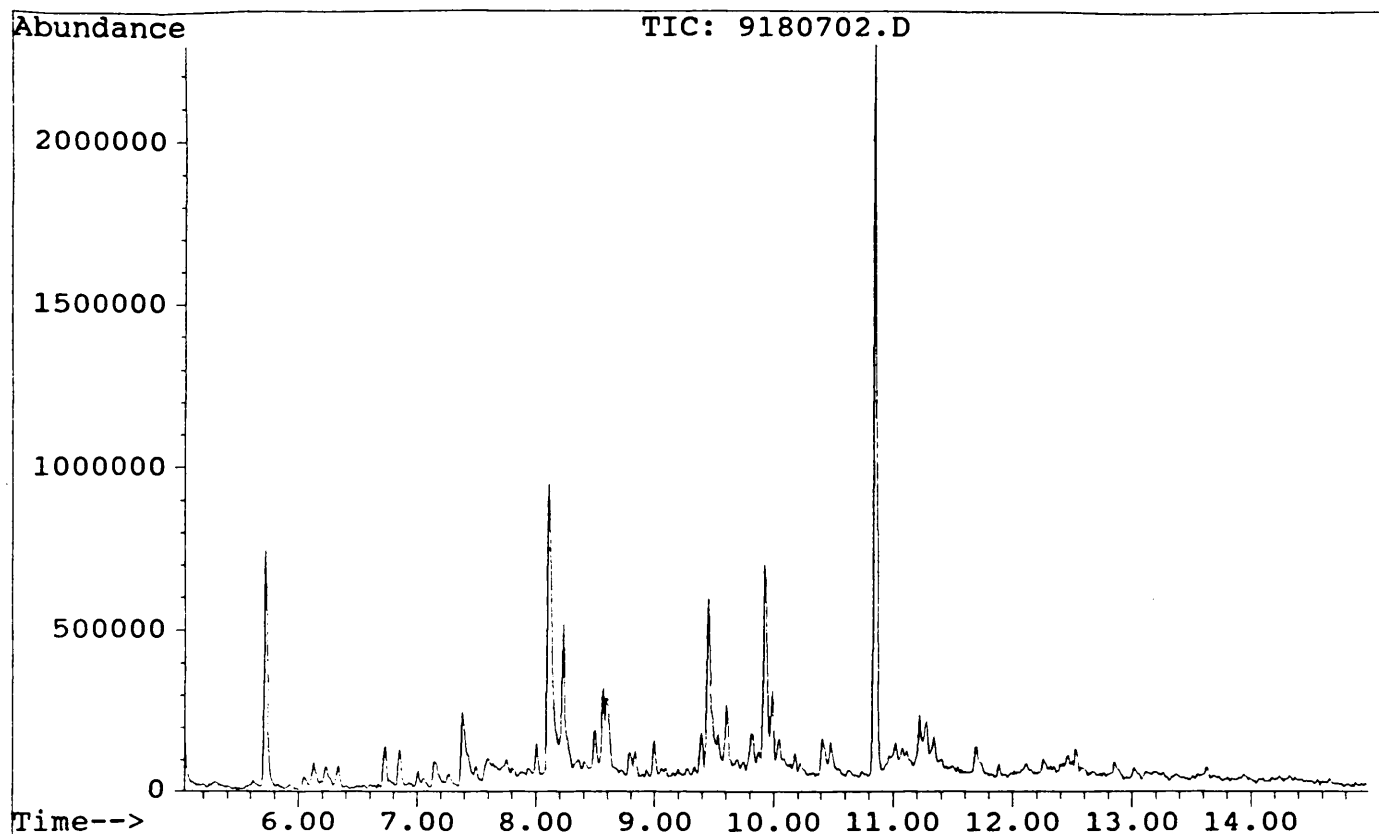


Figura 34. Cromatograma y Espectro de masas de la ecgonina metil ester

11.- LEY DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES
(LEY 31/1995)

11.- LEY DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES

(LEY 31/1995)

Se fundamenta esta ley en la normativa legal que busca el desarrollo de una política de protección de la salud de los trabajadores mediante la prevención de los riesgos derivados del trabajo, donde se configura en un marco general el desarrollar las distintas acciones preventiva en sintonía y concordancia con las decisiones de la unión europea con el compromiso de mejorar progresivamente las condiciones de trabajo y de conseguir estos objetivos conjuntamente y en armonía en los diferentes países europeos.

De la incorporación de España a la CEE se deriva la necesidad de integrar armónicamente dentro del contexto político comunitario la implementación de una acción política que mejor encause la prevención de los riesgos derivados del trabajo. El tratado de la unión europea ha reforzado y promovido mejoras en el medio laboral intentando aproximarse a la armonización en el progreso de las condiciones de seguridad y salud de los trabajadores.

Esta ley 31/1995 de Prevención de Riesgos Laborales se reviste de especial trascendencia al abarcar el universo del medio ambiente laboral, de la seguridad y la salud de los trabajadores, recogiendo de forma integrada la política de prevención de riesgos laborales, enfatizando en que es preciso establecer un adecuado nivel de protección de la salud de los trabajadores, frente a riesgos derivados de las condiciones de

trabajo, partiendo del reconocimiento del derecho de los trabajadores en el ámbito laboral a la protección de su salud e integridad.

El ámbito de aplicación de la ley incluye los trabajadores vinculados por una relación laboral en sentido estricto y tiene por finalidad mejorar y elevar el nivel de protección de la salud y la seguridad de los trabajadores, y busca articular obligaciones y responsabilidades de los individuos directamente relacionados con el hecho laboral, fomentando una cultura preventiva mediante la promoción de la mejora de la educación en todos sus niveles, involucrando a toda la sociedad en su conjunto, con el fin de alcanzar su objetivo social la protección del trabajador en el medio laboral. La protección del trabajador frente a los riesgos laborales exige una actuación y compromiso por parte de la empresa, que debe contemplar en todo momento desde el instante mismo del diseño del proyecto empresarial la planificación de la prevención de los riesgos laborales, así como de su permanente actualización a medida que se alteran las circunstancias laborales.

Es imprescindible que las medidas de acción preventivas sean adecuadas a la naturaleza de los riesgos detectados y el control de la efectividad de las mismas constituya la base de la prevención de riesgos laborales, de forma que estas medidas aliadas a una adecuada información y formación de los trabajadores se consolide, con el objetivo de mejor conocimiento de los riesgos derivados del trabajo, como de la forma de prevenirlos y evitarlos, adaptados en función de las

peculiaridades de cada actividad laboral y características de los individuos que las desarrollan.

La atención a la confidencialidad y el respeto a la intimidad en relación a las medidas particulares a adoptar en actuaciones de relación laboral que como por ejemplo tiene su aplicabilidad en el contexto de la investigación laboral de drogas de abuso o de análisis de drogas "in situ", fundamentalmente en aquellas funciones de elevada responsabilidad como manejo de armas y conducción de vehículos por ejemplo.

El artículo 2º del capítulo 1 de la Ley de Prevención de Riesgos Laborales expresa que esta tiene por objetivo promover la seguridad y la salud de los trabajadores a través de la aplicación de medidas y el desarrollo de actividades necesarias para la prevención de riesgos laborales. El artículo 4º del mismo capítulo se refiere a que debe tomarse un conjunto de medidas adaptadas en todas las fases de actividad de la empresa con el fin de evitar o disminuir los riesgos derivados del trabajo, que es la posibilidad de que un trabajador sufra un determinado daño derivado del trabajo, así como contempla todavía en este apartado todas aquellas medidas que deben ser adoptadas por la empresa de carácter colectivo o individuales, como son equipos de protección colectivo e individual para los trabajadores, procurando con estas medidas proteger los trabajadores de daños a la salud.

Cabe a la Administración Pública dice el artículo 7º del capítulo II de esta Ley el cumplimiento del desarrollo de las

funciones de promoción de la prevención de riesgos laborales el cumplimiento del desarrollo de las funciones de promoción de la prevención, asesoramiento técnico, vigilancia y control del cumplimiento de esta normativa, asesorada por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.(BOE num 269, nov/1995)(69).

Como se puede apreciar existe un compromiso y preocupación patente del Estado en los cuestionamientos médico-legales que pueden plantearse por ejemplo en cuanto a la exposición de drogas de abuso se refiere por parte de la población laboral, en virtud del riesgo a la salud y la integridad física implícitos que pueden derivarse de la exposición a las drogas de abuso en el medio laboral, que podrían contribuir a la accidentabilidad.

12.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

12.- RESULTADOS Y DISCUSION

12.1.- Screening de drogas de abuso por inmunoensayos y confirmación por gases masas(GC-MS)

En el presente trabajo hemos investigado las frecuencias de positividad a la exposición a drogas de abuso opiáceos, cannabis, cocaína, benzodiacepinas, anfetaminas y sus metabolitos, en el caso de los opiáceos la morfina, codeína y 6-MAM, para el cannabis el delta-9-tetrahidrocannabinol, en el caso de la cocaína la benzoylecgonina y ecgonina metilester, en las anfetaminas hemos investigado anfetamina y metanfetamina derivados de feniletilamina, en el caso de las benzodiacepinas el oxazepan, como marcadores biológicos, utilizando tres técnicas de screening por inmunoensayos (KIM, FPIA y CEDIA) y estableciendo su correlación de positividad con una técnica de referencia que fue el gases masas(GC-MS). Analizamos 5000, 627 y 111 muestras de orina en población laboral de plantilla en reconocimientos anuales, nuevo ingreso y rehabilitación de drogodependientes extrabajadores en tratamiento, respectivamente.

La definición de los positivos por inmunoensayo fue establecida previamente en los instrumentos a partir de determinados puntos de corte que para el método KIM fueron: para opiáceos 300 ng/mL, cannabis 50 ng/mL, cocaína 300 ng/mL, anfetaminas 1000 ng/mL y benzodiacepinas 100 ng/mL. Se consideraron positivos por FPIA a partir de los siguientes

puntos de corte: opiáceos 200 ng/mL, cannabis 25ng/mL, cocaína 300 ng/mL, anfetaminas 300 ng/mL y benzodiacepinas 200 ng/mL. Los positivos por CEDIA tuvieron un punto de corte para opiáceos 300 ng/mL, cannabis 50 ng/mL, cocaína 300 ng/mL, anfetaminas 1000 ng/mL y benzodiacepinas 300 ng/mL.

En el cuadro 1. se observa que ocurren bajas frecuencias a la exposición de drogas de abuso, prevaleciendo la exposición a benzodiacepinas en personal de plantilla, encontramos 243 muestras positivas por la técnica KIM, de las cuales se confirman todas las muestras positivas a opiáceos(100%), no detectamos prácticamente heroína apesar de haberlas pasado por el gases masas, porque no encontramos el marcador de exposición a la heroína el 6-MAM y porque los coeficientes morfina/codeína son bajos, por lo que corresponden a exposición a fármacos como el codeisan. En el caso de la cocaína se confirmó el 100% de los positivos en el screening, salvo para las muestras positivas a cannabis cuya confirmación fue de 96,4%. Nos encontramos con dos falsos positivos a cannabis debido a problemas en la especificidad y sensibilidad del anticuerpo en el procedimiento turbimétrico KIM, habiendo sido constatado interferencias con otras especies farmacológicas por encontrarse tomando macrólidos concretamente rifampicina, ocurriendo así una reacción cruzada.

En el gráfico 1. podemos observar la distribución de los 243 positivos a drogas de abuso de la población de plantilla por la técnica KIM. En el gráfico 2 sectorial analizamos la

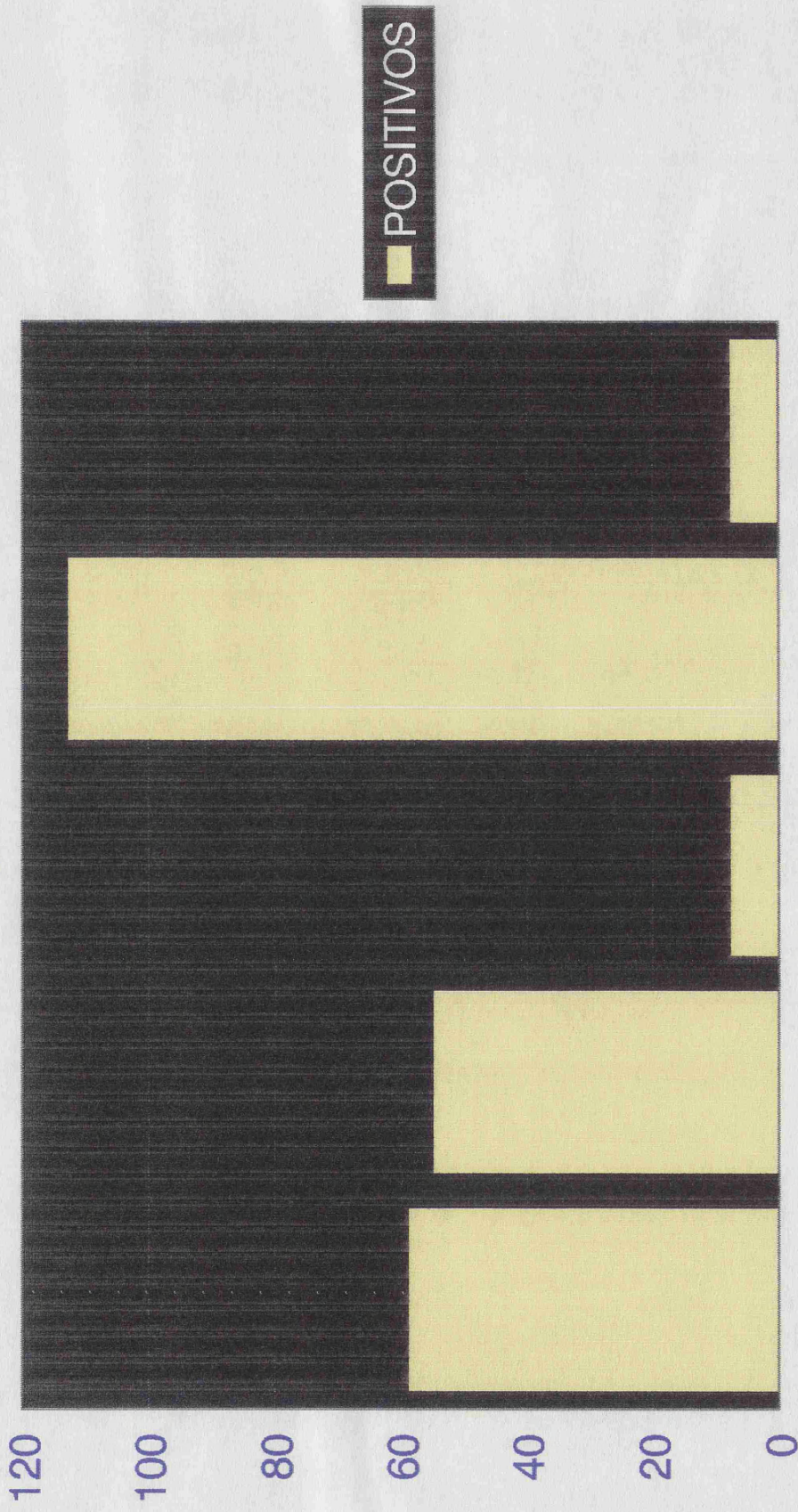
frecuencia porcentual de cada una de las drogas en este grupo de plantilla, siendo la mayor exposición a benzodiazepinas de un 46,5% y la menor frecuencia para cocaína y anfetaminas de 3,3% para ambas. En el cuadro 2 tenemos la comparación por métodos KIM y CEDIA de las frecuencias a la exposición a drogas de abuso de las 243 muestras positivas de las 5000 muestras analizadas en personal laboral de plantilla y observamos que se confirman por gases masas el 100% de las muestras positivas en CEDIA, sin embargo ocurren dos falsos positivos en KIM lo que ratifica la importancia de usar la técnica de confirmación gases masas. No fue posible confirmar por gases masas los positivos a benzodiazepinas ni a anfetaminas porque no era el objetivo de este trabajo, no obstante se observa un incremento en la exposición a estas drogas de abuso en el grupo de plantilla que puede tener importantes repercusiones en la siniestrabilidad laboral por ejemplo, en virtud de que el interés médico laboral está en establecer relaciones de la exposición a drogas de abuso con la presunción de riesgo en el momento de asumir el puesto de trabajo y durante el desempeño del mismo.

Determinación de drogas de abuso por KIM en 5000 muestras de orina en reconocimiento anual de una empresa de transportes en Madrid, 1994-95.

DROGAS	POSITIVOS	%	GC-MS	%
OPIACEOS	59	1,18	59	100
CANNABIS	55	1,1	53	96,4
COCAINA	8	0,16	8	100
BENZODIACE- PINAS	113	2,26	-	-
ANFETAMI - NAS	8	0,16	-	-

Cuadro 1. Fuente: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

Distribución de 243 casos positivos de drogas de abuso por KIM en 5000 muestras de orina de reconocimientos anuales del sector transportes de Madrid, 1994-95.



OPIACEOS CANNABIS COCAINA BENZOD. ANFETAM.

GRÁFICO 1. Fuente: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

Distribución de 243 casos positivos de drogas de abuso por KIM en 5000 muestras de orina de reconocimientos anuales del sector transportes de Madrid, 1994-95.

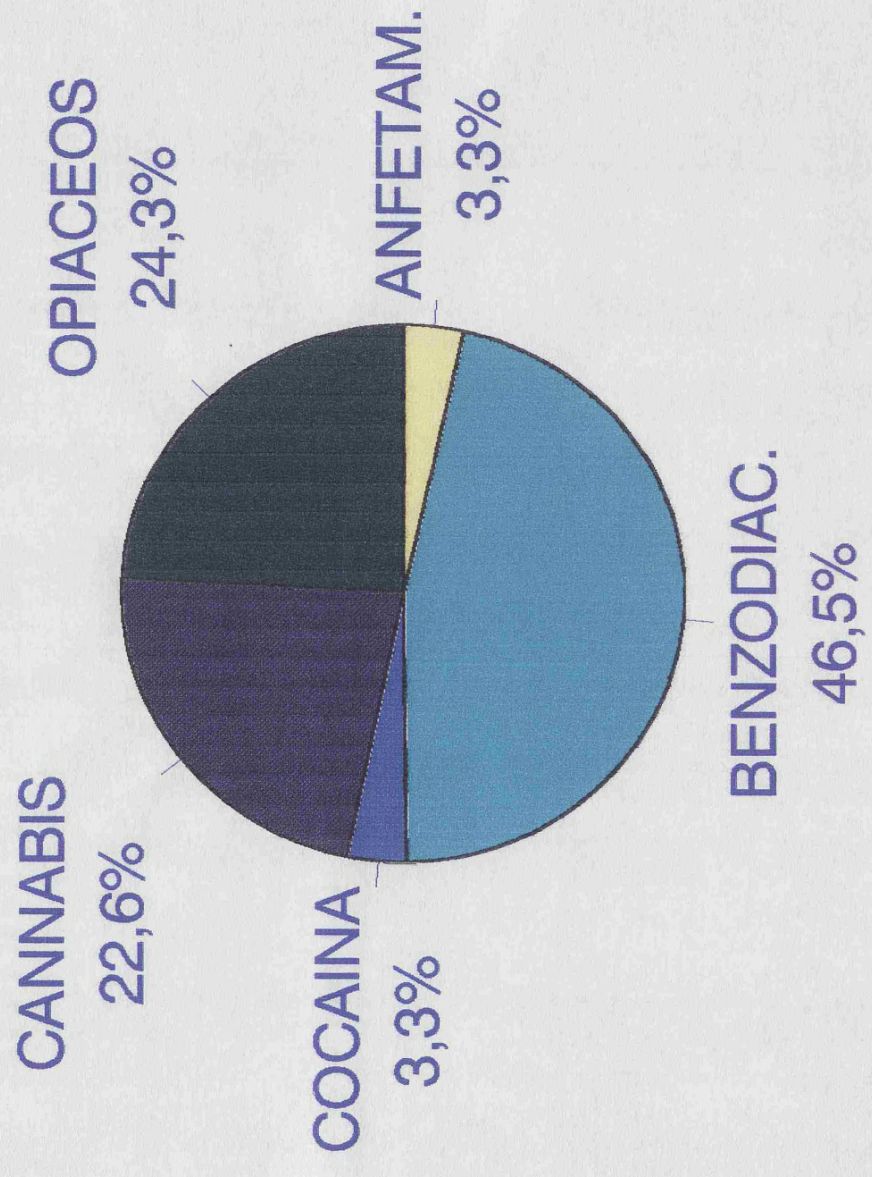


Gráfico 2 . FUENTE: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

Comparación por métodos de las frecuencias a la exposición de drogas de abuso de 243 muestras de orina positivas por inmunoensayos KIM y CEDIA de 5000 muestras analizadas en población laboral de plantilla, Madrid 1995.

DROGAS	KIM	CEDIA	GC-MS
OPIACEOS	59	59	59
CANNABIS	55	53	53
COCAINA	8	8	8
BENZODIAC.	113	111	-
ANFETAMIN.	8	5	-

Cuadro 2 .FUENTE: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

De estos resultados podemos desprender que las técnicas de screening por inmunoensayos son muy útiles en la investigación y presunción de drogas de abuso en orina en población laboral, en función de los puntos de corte que utilizemos. Sin embargo en el caso del cannabis se necesitaría aumentar para 50 o 100 ng/mL el punto de corte, conforme recomendaciones en la actualidad por el NIDA. Además porque los puntos de corte entre 25- 50 ng/mL son más que discutibles desde el punto de vista médico y técnico en la interpretación de resultados. Por otra parte en población laboral nuevo ingreso las frecuencias de exposición a drogas de abuso se resumen en el cuadro 3, donde observamos la distribución de 73 muestras positivas a drogas de abuso de un total de 627 muestras de orina analizadas por FPIA, donde se aprecia que la prevalencia al cannabis es mayor con frecuencias a la exposición de un 8,77% en relación a las otras drogas de abuso analizadas, no solo porque se consume más sino porque los metabolitos del cannabis pueden detectarse en orina hasta tres semanas después del consumo, debido a su capacidad de almacenarse en tejido adiposo, ya los metabolitos de opiáceos y cocaína son detectados hasta 72 hs después de la exposición. Sin embargo al confirmar las muestras positivas a drogas de abuso por gases masas(GC-MS), nos encontramos que el cannabis nos ha dado dos falsos positivos, debido a una reacción cruzada que pudo constatarse al encontrarse estos pacientes tomando macrólidos, concretamente rifampicina, esto en virtud del anticuerpo que usa la técnica ser policlonal y con esto de

menor especificidad y sensibilidad en relación a la técnica CEDIA por ejemplo. La confirmación por GC-MS de los positivos a opiáceos y cocaína por la técnica FPIA en esta población nuevo ingreso fue del 100%. En el gráfico 3, observamos la distribución de las 73 determinaciones positivas a drogas de abuso con 8 positivos a opiáceos, 55 positivos a cannabis, 6 positivos a cocaína, 2 positivos a anfetaminas y 2 positivos a benzodiacepinas. En el gráfico 4, podemos analizar la distribución sectorial de exposición a drogas de abuso de los 73 casos positivos de la población de nuevo ingreso, con prevalencia mayor al cannabis de 75,3% , seguido de 11,0% a opiáceos, de 8,2% a cocaína, 2,7% a anfetaminas y 2,7% a benzodiacepinas.

En el cuadro 4 y gráfico 5 observamos la distribución porcentual cuanto a sexo de la exposición a drogas de abuso analizadas por FPIA y CEDIA con su respectiva confirmación por gases masas en una submuestra de 226 orinas de población nuevo ingreso, donde apreciamos la elevada exposición de las mujeres a opiáceos que se constata ser por consumo de fármacos.

El cuadro 5 muestra la comparación de resultados de 393 muestras de orina analizadas por FPIA y CEDIA, encontrando en 34 positivas a FPIA 7 falsos positivos al cannabis por haberse constatado en estos el uso de macrólidos concretamente la rifampicina. Por otra parte se observa muy pocos falsos negativos en CEDIA en este caso 1 por encontrarse el punto de corte en 50 ng/mL.

Determinación de metabolitos de drogas de abuso por FPIA de 627 muestras de reconocimientos nuevo ingreso del sector transportes de Madrid, 1995-96.

DROGAS	POSITIVOS	%	GC-MS	%
OPIACEOS	8	1,27	8	100
CANNABIS	55	8,77	53	96,3
COCAINA	6	0,95	6	100
ANFETAMI NAS	2	0,31	-	-
BENZODIA CEPINAS	2	0,31	-	-

Cuadro 3. FUENTE: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

Distribución de casos positivos a drogas de abuso de 627 muestras nuevo ingreso analizadas por FPIA en 1995-96.

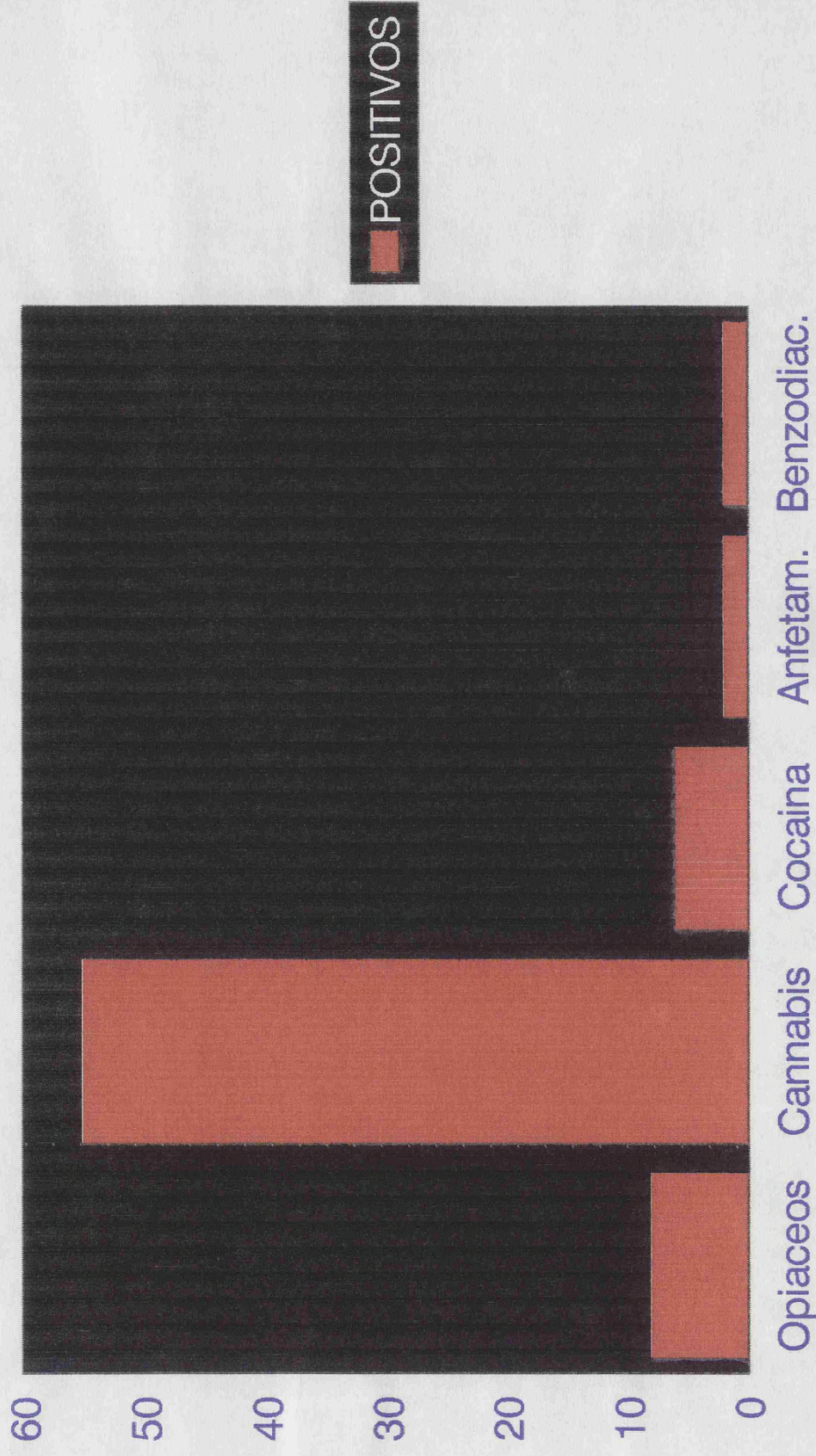


Gráfico 3. FUENTE: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

Distribución de 73 casos positivos de drogas de abuso por FPIA de una muestra de 627 orinas de población laboral nuevo ingreso en Madrid, 1955-96.

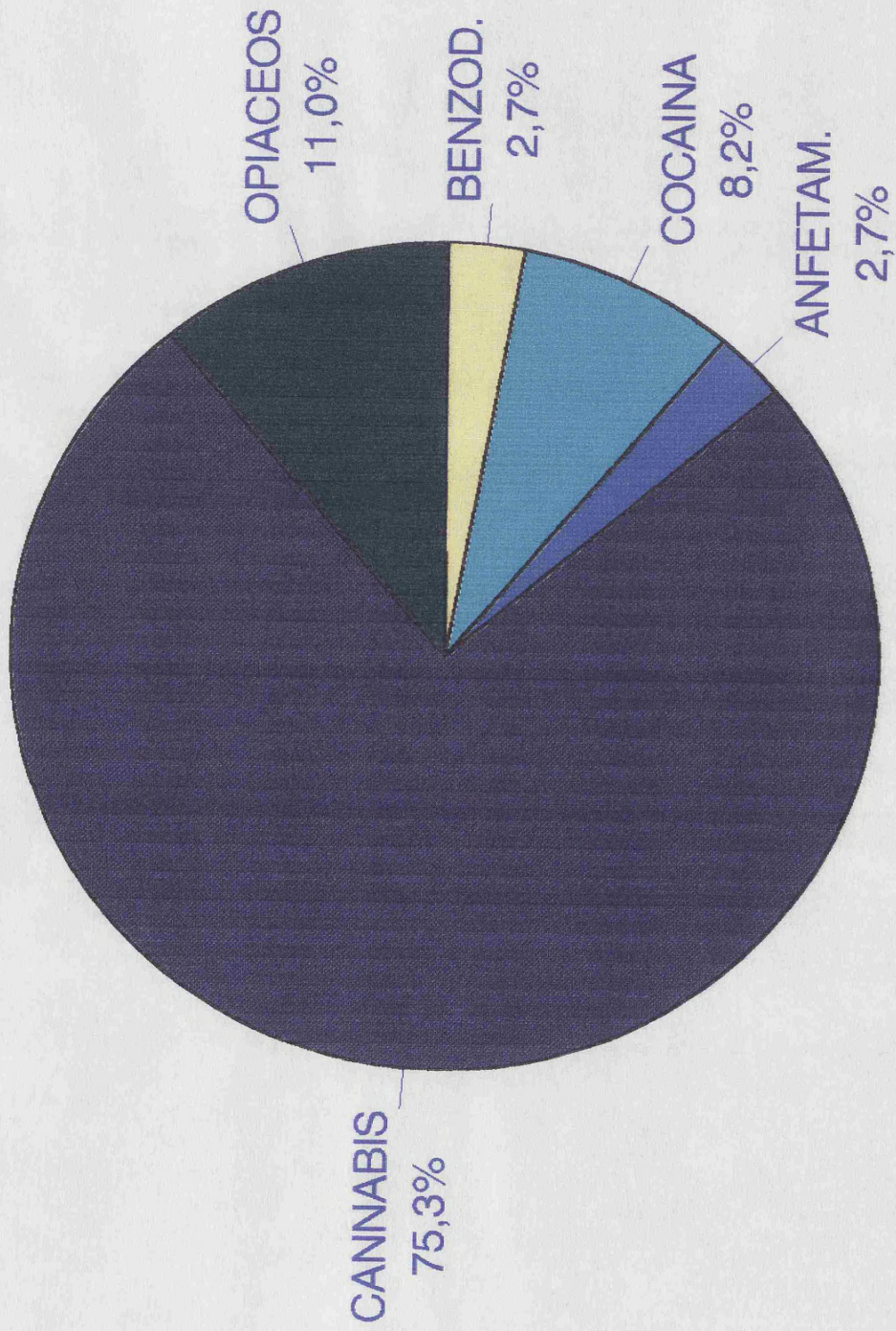


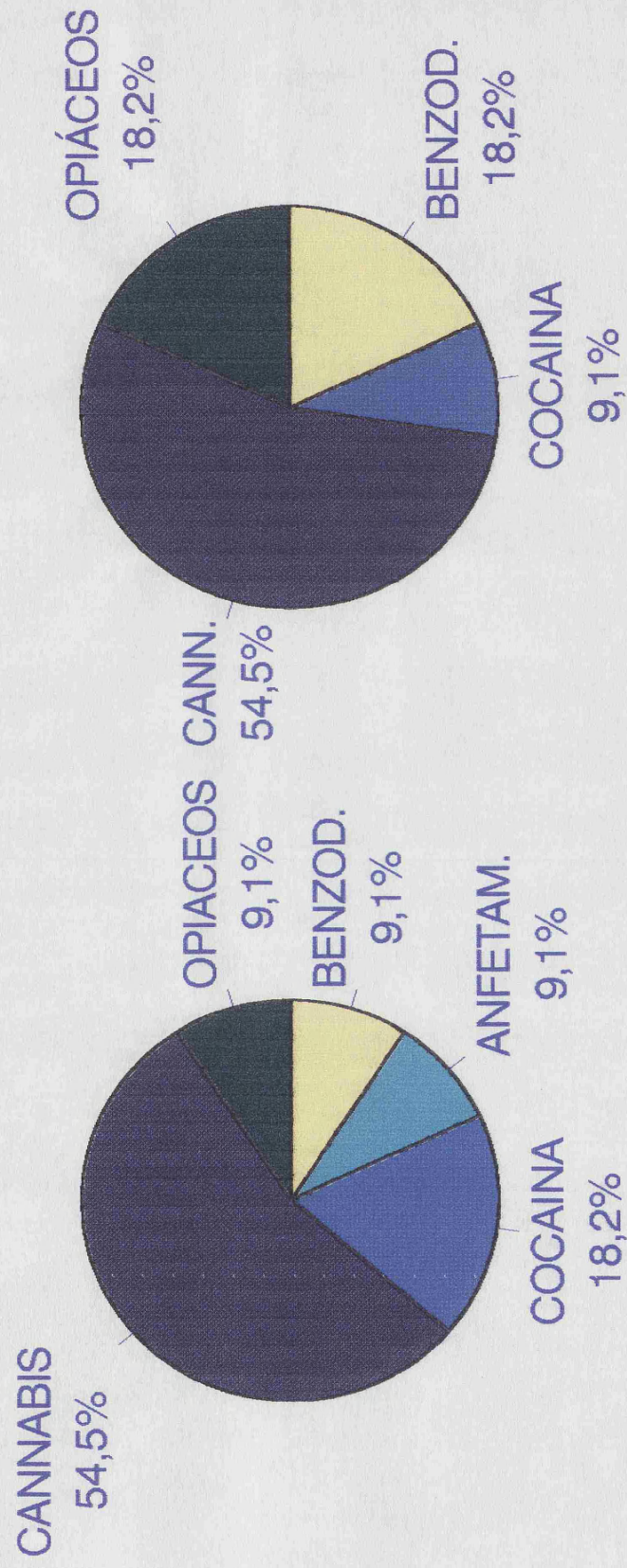
Gráfico 4. FUENTE: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

Distribución por sexo de una submuestra de 226 muestras de orina de población de nuevo ingreso positivas a drogas de abuso por técnicas FPIA y CEDIA y confirmadas por Gases Masas(GC-MS).

drogas	hombres	mujeres
opiáceos	1	2
cannabis	6	6
cocaina	2	1
anfetaminas	1	-
benzodiacepinas	1	2

Cuadro 4. FUENTE: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

Distribución porcentual en cuanto a sexo de la exposición de drogas de abuso confirmadas por GC-MS en una submuestra de 226 muestras de orina de población de nuevo ingreso en Madrid, 1995-96.



hombres 52,2%

mujeres 47,8%

Gráfico 5. FUENTE: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

COMPARACION DE 34 ORINAS POSITIVAS A DROGAS DE ABUSO POR
 FPIA Y CEDIA Y SU RESPECTIVA CONFIRMACION POR GASES MASAS EN
 UNA SUBMUESTRA DE 393 ORINAS DE NUEVO INGRESO, MADRID

1995-96

DROGAS	FPIA	CEDIA	GC-MS
opiáceos	5	5	5
cannabis	27	19	20
cocaina	2	2	2
benzodiace- pinas	-	-	-
anfetaminas	-	-	-

Cuadro 5. FUENTE: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

En el cuadro 6 observamos la frecuencia de positividades a drogas de abuso por enzimoimmunoensayo CEDIA de una muestra de 111 pacientes extrabajadores en tratamiento de rehabilitación de drogodependencia en una clínica de rehabilitación en Madrid. En este grupo ocurren frecuencias más elevadas de exposición a drogas de abuso en el screening cuando comparadas a las poblaciones laboral de plantilla y nuevo ingreso, prevaleciendo un incremento de exposición a las benzodiazepinas con 95 positivos(85,5%), seguido del cannabis 14 positivos(12,6%), cocaína 6 positivos(5,4%), opiáceos 4 positivos(3,6%) y anfetaminas 3 positivos(2,7%). Todos los positivos en CEDIA se confirmaron por gases masas al 100%, excepto las anfetaminas y benzodiazepinas que como ya hemos explicado anteriormente no era objetivo de nuestra investigación, porque para tal fin debía diseñarse una técnica especial para su determinación.

El gráfico 6 muestra la distribución de los 122 casos positivos a drogas de abuso por CEDIA de este grupo de drogodependientes que en elevado número son también policonsumidores de drogas de abuso y su confirmación por gases masas.

En el cuadro 7 se presenta la distribución de las muestras positivas a drogas de abuso por FPIA de 111 muestras de orina de drogodependientes con una prevalencia mayor para exposición al cannabis principalmente, si consideramos en relación a la población de plantilla y nuevo ingreso. En el gráfico 7 tenemos la distribución de los 116 casos positivos a drogas de

abuso analizadas por FPIA del grupo de drogodependientes y su respectiva confirmación por gases masas.

Proponemos con este estudio un método de trabajo en el mundo laboral que consiste en establecer un protocolo de métodos de laboratorio para determinar drogas de abuso en orina y que consiste en aplicar a unas muestras sometidas a una cadena de custodia con consentimiento informado por escrito, respetando la confidencialidad identificando las muestras con códigos de barra y de carácter voluntario, unas técnicas de screening de inmunoensayos, concretamente KIM, FPIA y CEDIA. Debemos decir que en nuestra experiencia la técnica CEDIA demuestra ser la más ventajosa por ser automatizable en analizadores convencionales y por tratarse de un aparato que requiere de un reducido costo de mantenimiento en relación a las otras dos técnicas estudiadas.

En el estudio encontramos frecuencias muy bajas de exposición a drogas de abuso en población laboral de plantilla, proponemos que puede ser de mucha utilidad aplicar este protocolo de trabajo en análisis de drogas "in situ" por razones económicas y de costos.

Opinamos que el cannabis es un elemento a discutir en virtud de los puntos de corte que sean utilizados en la aplicación de la técnica. La interpretación de un resultado positivo a cannabis en cifras < 50 ng/mL tienen utilidad desde el punto de vista médico-laboral y no tienen interés ni operatividad desde el punto de vista de laboratorio, con lo cual justifica que se coloque el punto de corte en 50 ng/mL

porque los resultados entre 25-50 ng/mL son más que discutibles, o bien colocar el cut off en 100 ng/mL como recomienda el NIDA actualmente.

En relación a la cocaína y opiáceos se confirman bien por gases masas las muestras positivas en el screening por inmunoensayos. Sin embargo se debe interpretar correctamente los resultados de opiáceos considerando los niveles y el cociente codeína/morfina y 6-MAM(6-monoacetil morfina). Finalmente las benzodiacepinas y las anfetaminas que aunque no pudieron ser confirmadas son un interesante elemento de discusión en análisis presuntivos de inmunoensayos, cuanto a su utilidad en relación a considerar si médico laboralmente un sujeto expuesto a esta droga de abuso estaria apto o no temporalmente al puesto de trabajo que le corresponda en función de establecer una presunción a un riesgo laboral en virtud de la nueva ley de prevención de riesgos laborales que ha entrado en vigor recientemente.

Por último en el cuadro 8 comparamos las frecuencias de exposición a drogas de abuso en las poblaciones laboral de plantilla, nuevo ingreso y drogodependientes, siendo de 2,44%, 10,99% y 21,6% respectivamente.

Distribución de las frecuencias de positividad de drogas de abuso en 111 muestras de orina por CEDIA de drogodependientes, Madrid 1995-96.

DROGAS	POSITIVOS	%	GC-MS	%
OPIACEOS	4	3,6	4	100
CANNABIS	14	12,6	14	100
COCAINA	6	5,4	6	100
BENZODIA CEPINAS	95	85,5	-	-
ANFETAMI NAS	3	2,7	-	-

CUADRO 6. Fuente: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

Distribución de 122 casos positivos de drogas de abuso por CEDIA de drogodependientes en Madrid 1995-96.



Gráfico 6. FUENTE: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

Distribución de las muestras positivas a drogas de abuso por FPIA de 111 muestras de orina en drogodependientes en Madrid, 1995-96.

DROGAS	POSITIVOS	%	GC-MS	%
OPIACEOS	4	3,6	4	100
CANNABIS	29	26,1	27	93,1
COCAINA	6	5,4	6	100
BENZODIACE- PINAS	75	67,5	-	-
ANFETAMI - NAS	2	1,8	-	-

Cuadro 7. FUENTE: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

Distribución de 116 casos positivos de drogas de abuso por FPIA y su confirmación por GC-MS en drogodependientes en Madrid, 1995-96.

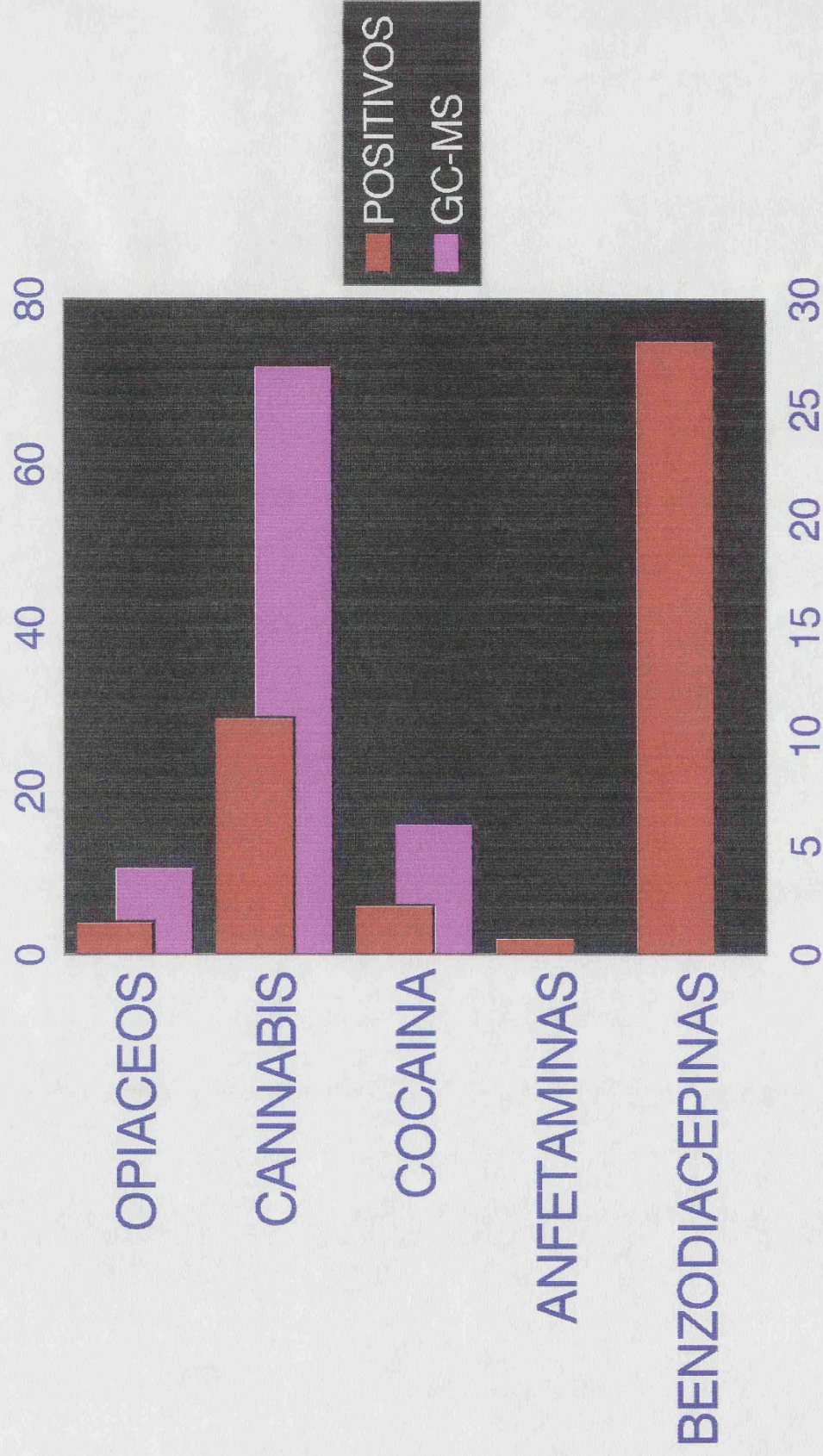


Gráfico 7. FUENTE: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

Comparación de las frecuencias de exposición de drogas de abuso en poblaciones laborales de plantilla, nuevo ingreso y drogodependientes en Madrid, 1996.

POBLACIONES	EXPOSICION
PLANTILLA	2,44%
N. INGRESO	10,99%
DROGODEPEND.	21,6%

Cuadro 8. FUENTE: Laboratorio de Análisis Clínico - TENEO

13.- CONCLUSIONES

13.- CONCLUSIONES

1ª.- HEMOS ENCONTRADO EN POBLACION LABORAL DE PLANTILLA, DE NUEVO INGRESO Y REHABILITACION DE DROGODEPENDIENTES UNAS FRECUENCIAS DE POSITIVIDADES POR INMUNOENSAYOS A LA EXPOSICION DE DROGAS DE ABUSO PARTICULARMENTE A CANNABIS DE 1,1%, 8,77% Y 12,6% RESPECTIVAMENTE. A OPIACEOS DE 1,18%, 1,27% Y 3,6% RESPECTIVAMENTE. A COCAINA DE 0,16%, 0,95% Y 5,4% RESPECTIVAMENTE, RATIFICADAS POR LA TECNICA DE REFERENCIA GASES MASAS.

2ª.- PROPONEMOS COMO PUNTOS DE CORTE EN VIRTUD DE SU MÁXIMA PROBABILIDAD PARA SER CONFIRMADOS POR GASES MASAS LOS SIGUIENTES: OPIACEOS 300 ng/mL, COCAINA 300 ng/mL, CANNABIS 50 ng/mL. SIENDO EL METODO DE ENZIMOINMUNOENSAYO CON ANTICUERPOS MONOCLONALES (CEDIA) EL MÁS ÚTIL PARA EL SCREENING DE DROGAS EN VIRTUD DE SU CAPACIDAD PARA SER AUTOMATIZABLE EN AUTOANALIZADORES CONVENCIONALES.

3ª.- DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS SE DESPRENDE QUE LAS FRECUENCIAS DE EXPOSICION A DROGAS DE ABUSO EN POBLACION LABORAL DE PLANTILLA Y DE NUEVO INGRESO ES RESPECTIVAMENTE DE 2.44% Y 10.99%, LO QUE PERMITE CUESTIONAR LA UTILIDAD DE INVESTIGAR METABOLITOS DE DROGAS DE ABUSO IN SITU EN LUGAR DE UTILIZAR LOS RECONOCIMIENTOS MEDICO LABORALES, EN FUNCION DE ESTABLECER UNA MEJOR PRESUNCION DE RIESGO ACORDE CON LOS PLANTEAMIENTOS DE LA LEY DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES.

4ª.- AUNQUE LA OBTENCION DE MUESTRAS EN NUESTRO TRABAJO A TENIDO QUE SER VOLUNTARIA Y ANONIMA PROPONEMOS QUE CON UN INTERES MEDICO LEGAL LA INVESTIGACION DE METABOLITOS DE DROGAS DE ABUSO EN POBLACION LABORAL EXIGE A NUESTRO JUICIO CUMPLIMENTAR LOS SIGUIENTES REQUISITOS:-DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO,-ELABORACION DE UNA CADENA DE CUSTODIA ACREDITADA DOCUMENTALMENTE,-CONFIRMAR MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE GASES MASAS TODAS LAS PRUEBAS POSITIVAS POR METODOS DE SCREENING,-REALIZAR INFORME TOXICOLOGICO CON LA INTERPRETACION DE RESULTADOS CORRESPONDIENTE FUNDAMENTALMENTE EN LOS CASOS DE POSITIVOS A OPIACEOS Y CANNABIS.

5ª.- LAS FRECUENCIAS DE RESULTADOS POSITIVOS PARA ANFETAMINAS OBTENIDAS MEDIANTE TECNICAS DE SCREENING EN LAS POBLACIONES LABORAL DE PLANTILLA, NUEVO INGRESO Y DROGODEPENDIENTES HA SIDO RESPECTIVAMENTE DE 0,16%, 0,31% Y 2,7%, LO QUE JUSTIFICA A NUESTRO JUICIO SU INVESTIGACION EN LOS PROTOCOLOS DE ANALISIS MEDICO LABORALES, PROPONEMOS SE REALICEN TRABAJOS MAS AMPLIOS DONDE MEDIANTE LA CONFIRMACION POR GASES MASAS JUSTIFIQUE UNA INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS EN RELACION CON LA PRESUNCION DE RIESGOS LABORALES.

6ª.- LAS FRECUENCIAS A EXPOSICION A BENZODIACEPINAS OBTENIDAS EN LAS POBLACIONES LABORALES DE PLANTILLA Y NUEVO INGRESO ASI COMO DROGODEPENDIENTES HA SIDO RESPECTIVAMENTE DE 2,26%, 0,31% Y 67,5%. PROPONEMOS LA INVESTIGACION MAS AMPLIA Y

DETALLADA DE ESTA CASUISTICA Y SU CONFIRMACION POR GASES MASAS
POR CUANTO PUEDIERAN INFLUIR EN LA ACTITUD EN EL TRABAJO DE
PERSONAS SOMETIDAS A AUTOMEDICACION Y EN LA INVESTIGACION DE
LA TRANSGRESION DEL CONTRATO TERAPEUTICO EN POBLACION
DROGODEPENDIENTE SOMETIDA A REHABILITACION.

14.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- COLE,M.D.;CADDY,B. Forensic Science Unit, University of Strathelyde. Ed. Ellis Horwwod Series in Forensic Science 1995.
- 2.- FULLER,R.K. Alchohol e Alcohol, suppl 2. pp. 103-106, 1993.
- 3.- WIELL,J.;SCHELLENBER.F. Alcohol e Alcholism, suppl 2. pp 107-110, 1993.
- 4.- AUBÁ,J.;SERRANO,M.;FRUTOS,D.;MIRA,M. Medicina Clínica 100(1), pp. 5-8, 1993.
- 5.- CORRONS,V.L.J. Medicina Clínica 91, pp. 264-266, 1988.
- 6.- PLA,A.;HERNÁNDEZ,F.A.;VILLANUEVA,E. Medicina Clínica 91(18), pp.710-715, 1988.
- 7.- STEVENS,J.V.;FANTL,J.W.;NEWMAN,B.C. J. Clin. Invest. 67, pp.361-369, 1981.
- 8.- BEHRENS,J.U.;HOERNER,M.;LASKER,MJ.;LIEBER,C.S. Biochemical and Biophysical Research Communications 154(2), pp.584-590, 1988.
- 9.- WEHR,H.;RODO,M.;LIEBER,S.C.;BARAONA,E. Journal of Lipid Research. 34, 1993.
- 10.- BRAITHWAITE,R.A.;JARVIE,D.R.;MINTY,B.S.P.; SIMPSON,D.; WIDDOP. Ann. Clin. Biochem. 32: 123-153, 1995.
- 11.- CONE,J.E.;WELCH,P. Journal of Analytical Toxicology 15: 1-7, 1991.
- 12.- HANISCH,W.MEYER,V.L. Journal of Analytical Toxicology 17: 48-50, 1993.
- 13.- MITCHELL,M.J.;BUDDHA,D.P. Journal of Analytical Toxicology 15:49-53, 1991.
- 14.- CONE,J.E.;WELCH,P. Journal of Analytical Toxicology 15:161-166, 1991.
- 15.- HAYES,W.L.;DRASSELT,G.W.;MUEGGLER,A.P. Clin. Chem. 33 (6): 806-808, 1987.
- 16.- SAWYER,R.W.;WATERHOUSE,W.A.G.;DOEDENS,J.D.;FORNEY,B.R. Journal of Forensic Science 33(5): 1146-1155,1988.
- 17.- SELAVKA,M.C. Journal of Forensic Science,36(3): 685-696,1991.
- 18.- GONZÁLEZ,G.R.;BANDRÉS,M.F. Análisis de Drogas de Abuso en Orina, Fundación Laboral Servicios Asistenciales, Madrid, 1993.

- 19.- GOLDBERGER,A.B.;CONE,J.E. Journal of Chromatography A, 674 pp.73-86, 1994.
- 20.- CHAPMAN,J.D.;CROSS,J.M.;JOEL,P.S.;AHERNE,W.G. Ann. Clin. Biochem. 32, pp.297-302, 1995.
- 21.- MONOGRAFIA LABORATORIO ABBOTT, Drogas de Abuso 1994.
- 22.- RAMOS,A.A.J. Neurobiologia de la Drogadicción Ed. Eudema S.A., 1993.
- 23.- GOLDSTEIN,A. Addiction, Ed. W.H Freeman and Company, 1994.
- 24.-LÓPEZ,M.;LÓPEZ,C.J.;SEGURA,L.;ABENZA,M.J.;BANDRÉS,F. Informe sobre la Marihuana, 1985.
- 25.- GOLD,S.M. Marihuana. Nueva Jersey, Ediciones en Neurociencias, 1991.
- 26.- NACIONES UNIDAS. Métodos Recomendados para el ensayo de la Cannabis, Nueva York, 1987.
- 27.- GOODMAN E GILMAN'S. The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, Mc Graw-Hill, 1995.
- 28.- HUESTIS,A.M.;HENNINGFIELD,E.J.;CONE,J.E. Journal of Analytical Toxicology, 16, pp.276-282, 1992.
- 29.- WELLS,J.D.;BARNHILL,T.M. Clin Chem. 35(11): 2241-2243, 1989.
- 30.- RICE-LICAR,J.;DELANEY-MCLOUGHLIN,K. Cocaína Soluciones Ed. en Neurociencias Barcelona, 1996.
- 31.- GOLDSTEIN,A. Adicción, Ed. en Neurociencias Barcelona, 1995.
- 32.- MORILD,I.STAJIC,M. Forensic Science International, 47: 181-189, 1990.
- 33.- MILLER,N.S. The Pharmacology of Alcohol and Drugs of Abuse and Addiction, Ed. Springer-Verlag, New York, 1991.
- 34.- TAMISIER,KAROLAK,L.;TOD,M.;PETITJEAN,O.;CARDOT,J.P. Chromatographia, 36, pp.368-372, 1993.
- 35.- EARLEY,P.H. The cocaine Recovery Book, Ed. Sage Publications U.S.A. , 1991.
- 36.- VOIGT,L. Ana J. 63 (5): 438-43, 1995.
- 37.- RAMCHARITAR,V.;LEVINE,B.; SMIALEK,J.E. Journal of Forensic Sciences, 40(1) pp. 99-101,1995.

- 38.-HIPPENSTIEL, J.J.; GERSON, B. Journal of Analytical Toxicology, 18, pp. 201-205, 1994.
- 39.- ZHANG, J.Y.; FOLTZ, R.L. Journal of Analytical Toxicology, 14, pp. 201-205, 1990.
- 40.- CORBURN, M.R.; KOVES, E.M. 39(1): 136-149, 1994.
- 41.- HEARN, W.L.; KERAN, E.E.; WEI, H.; HIME, G. Journal of Forensic Science, 36(3): 673-684, 1991.
- 42.- WARD, C.; McNALLY, A.J.; RUSYNIAK, D.; SLAMONE, S.J. Journal of Forensic Sciences, 39(6) pp. 1486-1496, 1994.
- 43.- DASGUPTA, A.; SALDANA, S.; KINNAMAN, G.; SMITH, M.; JOHANSEN, K. Clin. Chem. 39(1), pp. 104-108, 1993.
- 44.- MANUAL ADX SISTEM ABBOTT, División Diagnóstica, 1-6, 1995.
- 45.- ARMBRUSTER, A.D.; SCHWARZHOFF, H.R.; HUBSTER, C.E.; LISERIO, K. Clin. Chem. 39(10), pp. 2137-2146, 1993.
- 46.- WILSON, F.J.; SMITH, L.B.; TOSELAND, A.P.; WILLIAMS, J.; BURNETT D.; HIRST, D.A.; WATSON, D.I.; HORN, N.A. Ann. Clin. Biochem. 31: 335-342, 1994.
- 47.- CHRISTOPHERSEN, S.A.; MORLAND, J. Pharmacology e Toxicology, 74, 202-210, 1994.
- 48.- ZWERLING, C.; RYAN, J.; ORAV, J.E. Jama, 264(20), 1990.
- 49.- MANUAL DEL MÉTODO COBAS MIRA, Laboratorio Roche, 1995
- 50.- ARMBRUSTER, D.A.; SCHWARZHOFF, R.H.; HUBSTER, E.C.; LISERIO, M.K. Clin. Chem. 39(10), pp. 2137-2146, 1993.
- 51.- WILSON, J.F.; WILLIAMS, J.; WALKER, G.; TOSELAND, P.A.; SMITH, B.L.; RICHENS, A.; BURNETT, D. Clin Chem 37(3), pp. 442-447, 1991.
- 52.- WU, A.H.B.; WONG, S.S. Journal of Analytical Toxicology, 17, pp. 241-245, 1993.
- 53.- BAKER, D.P.; MURPHY, M.S.; SHEPP, P.F.; ROYO, V.R.; CALDARONE, M.E.; ESCOTO, B. SALAMONE, S.J. Journal of Forensic Sciences, 40(1), pp 108.112, 1995.
- 54.- McBAY, A.J. Clin. Chem. 33/11 (B), 33 B-40 B, 1987.
- 55.- HENDERSON, D.R.; FRIEDMAN, S.B.; HARRIS, J.D.; MANNING, W.B.; ZOCCOLI, M.A. Clin. Chem. 32(9), pp. 1637-1641, 1986.
- 56.- MONOGRAFIA BOEHRINGER MANNAHEIM, 1994.
- 57.- ARMBRUSTER, A.D.; HUBSTER, C.E.; KAUFAMAN, S.M.; RAMÓN, K.M. Clin. Chem. 41(1), pp. 92-98, 1995.

- 58.- AMBRE, J. Journal of Analytical Toxicology, 9, pp.241-245, 1985.
- 59.- AMBRE, J.; TUO, T. I.; NELSON, J.; BELKNAP, S. Journal of Analytical Toxicology, 12, pp.301-306, 1988.
- 60.- ETTRE, L. S. Nomenclatura para Cromatografía, Ed. GCTA (RSEQ), 1995.
- 61.- VARCÁCEL, M. C.; GÓMEZ, A. H. Técnicas Analíticas de Separación, Ed. Reverte, S. A., Barcelona, 1990.
- 62.- CHAMBERLAIN, J. Analysis of Drugs in Biological Fluids, Ed. CRS Press, Inc., Florida, 1987.
- 63.- PFLEGER, K.; MAURER, H.; WEBER, A. Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons and Their Metabolites, Ed. VCH, Part I, 1985.
- 64.- JENNINGS, W. Gas Chromatography with Glass Capillary Columns, Ed. Academic Press, New York, 1978.
- 65.- McMURRY, J. Organic Chemistry, 3ª ed, 1992.
- 66.- McLAFFERTY, F. W. Interpretación de los espectros de masas, Ed. Reverte, S. A., Barcelona 1969.
- 67.- STREITWIESER, A. JR.; HEATHCOCK, C. H. Química Orgánica, 3ª ed., 1993.
- 68.- BEYERMANN, K. Organic Trace Analysis, Ed. Ellis Horwood Limited, England, 1984.
- 69.- LEY 31/1995 de 8 de noviembre de Prevención de Riesgos Laborales (BOE num 269), España 1995.