



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA EN ORINA
DE METABOLITOS DE BENZODIACEPINAS**

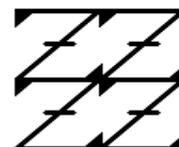
**TESINA
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA
JESSICA HERNÁNDEZ PÉREZ**

**ASESOR
QFB. VICTOR HUGO BECERRA LÓPEZ**

MEXICO D.F.

MARZO 2009



LO HUMANO EJE DE
NUESTRA REFLEXION



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Marco teórico	
3.1. Drogadicción problema social.....	4
3.2. Relación de las benzodiazepinas en hechos delictivos.....	5
3.3. Descripción de las propiedades físicas y químicas de las benzodiazepinas....	6
3.4. Farmacología de las benzodiazepinas.....	9
3.5. Mecanismo de acción de las benzodiazepinas.....	16
3.6. Metodología y técnicas presuntivas para la identificación de benzodiazepinas.....	20
3.7. Fundamentos de los métodos.....	24
3.7.1. RIA.....	24
3.7.2. FPIA.....	26
3.7.3. EMIT.....	27
3.7.4. ELISA.....	28
3.7.5. CG/MS.....	30
3.7.6. HPLC.....	33
3.8. Ventajas y desventajas de los inmunoensayos.....	34
4. Planteamiento del problema.....	38
5. Objetivos.....	39
6. Diseño metodológico.....	40

7. Resultados.....	41
8. Discusión de resultados	46
9. Conclusiones.....	47
10. Propuesta.....	48
11. Lista de referencias.....	49

1. Resumen.

Desde el punto de vista medico-legal las intoxicaciones por fármacos, en particular las benzodiazepinas, son un grupo farmacológico relativamente extenso con una gran variedad de efectos sobre el organismo, este hecho es de gran importancia ya que existen referencias en las cuales se reporta que este tipo de fármacos se utilizan para cometer una serie de delitos, por esta razón la realización de este proyecto tiene como finalidad, investigar y documentar desde el punto de vista químico-legal , el fundamento de las técnicas presuntivas y confirmatorias para la identificación de este tipo de fármacos en muestras de orina. Para llevar acabo la realización de este trabajo se recopilo información que abarca desde la drogadicción, relación de las benzodiazepinas en hechos delictivos, propiedades físicas y químicas así como su farmacología y mecanismo de acción, los fundamentos de las reacciones que se llevan a cabo en la realización de las pruebas presuntivas y confirmatorias para su identificación. Posteriormente se revisó, seleccionó, depuro y sintetizó la información recabada la cual dió como resultado un cuadro de ventajas y desventajas de estas técnicas con respecto a las técnicas colorimétricas. Finalmente esta información presenta de forma didáctica y concreta cual es el fundamento de las técnicas así como algunas ventajas y desventajas de cada una de ellas para la identificación de drogas en el laboratorio toxicológico.

2. Introducción.

En la actualidad toda la sociedad esta expuesta a las drogas, la presencia y el consumo de sustancias psicotrópicas no es algo nuevo en ninguna sociedad. Por el contrario, su existencia está documentada en la historia de la mayoría de las culturas, con variaciones en los tipos de drogas, los patrones de uso, sus funciones individuales y sociales y las respuestas que las sociedades han ido desarrollando a través del tiempo, algunas de estas drogas son medicamentos con finalidad terapéutica pero el abuso de estos medicamentos, tienen efectos mortales o que producen cambios en la conducta, por ejemplo el uso de fármacos como las benzodiacepinas. El centro de integración juvenil realizó una encuesta a 10,423 personas que acudieron a un tratamiento en este centro entre enero y junio del 2007 las cuales informaron haber consumido sustancias psicoactivas obteniendo que las drogas de mayor consumo fueron: bebidas alcohólicas (90.2%), tabaco (87.0%), marihuana (70.6%), cocaína en polvo blanco (55.3%), crack (38.6%), solventes o removedores (24.0%), pegamentos (16.7%), metanfetaminas (15.6%), benzodiacepinas (10.4%) y Rohypnol (9.0%) estas dos ultimas drogas que se mencionan se absorben por completo al ser ingeridas por vía oral alcanzando la circulación sistémica después de su administración eliminándose por la orina en forma de metabolitos activos pudiéndose determinar por diferentes procedimientos analíticos especializados. En consecuencia, se han desarrollado varios métodos para determinar drogas de abuso en orina, plasma/suero, bilis, pelo y otros en muestras clínicas y forenses. En este trabajo se describen los fundamentos de las técnicas presuntivas y confirmativas para la determinación de benzodiacepinas en muestras de orina, pero cabe resaltar que también se pueden identificar otras drogas, por estos métodos un claro ejemplo de estas drogas son: las anfetaminas, cannabinoides, cocaína y benzoilecgonina, morfina, y metabolitos, fenciclidina, benzodiacepinas, antidepresivos tricíclicos, barbitúricos, opiatos, anestésicos locales y metadona. El laboratorio forense emplea una variedad de procedimientos analíticos; primero, realiza pruebas inespecíficas que determinan la presencia o ausencia de grupos de sustancias toxicas en las muestras, estas técnicas presuntivas preliminares son análisis rápidos, para poner de manifiesto la presencia o ausencia de un grupo de analitos ya que estas pruebas son orientativas, por lo que siempre habrá que confirmar el resultado por una segunda técnica específica.

Los fundamentos de los métodos de identificación que se describirán pueden dividirse esquemáticamente en 3 grupos:

➤ Identificación mediante reacciones colorimétricas, por ejemplo:

La reacción de Trinder para la identificación de salicilatos;

La reacción de Forest para las imipraminas;

La reacción de Pari para los barbitúricos.

➤ Identificación por métodos inmunológicos, por ejemplo:

Radio inmunoensayo

Fluoroimmunoensayo

➤ Las técnicas de identificación cromatográficas, por ejemplo:

Cromatografía en capa fina (CCF)

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Cromatografía de gases espectrometría de masas (CG/MS)

Es obvio que en algunos casos difíciles, las técnicas de confirmación por excelencia es la espectrometría de masa junto con la CFG (Cromatografía de Gases) o el HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución). Son herramientas fundamentales para el análisis toxicológico que permiten una identificación sin lugar a dudas.

Después de recabar la información de artículos y libros se fue seleccionando y revisando esta para después sintetizarla y generar este documento en el cual se describen varios aspectos de estos fármacos así como su previa identificación mediante técnicas inmunológicas, de esta forma, y ante los diferentes métodos existentes, es importante generar un cuadro en el cual se describen las ventajas y desventajas de estas técnicas ya que para quienes no intervienen directamente en el trabajo del laboratorio, esta información pueda proporcionarles de manera concreta una perspectiva de cómo se desarrolla la identificación presuntiva de los metabolitos activos de benzodiazepinas en muestras de orina.

3. Marco teórico.

3.1. Drogadicción problema social.

A lo largo de la historia cada cultura y cada sociedad han desarrollado e integrado en su seno el consumo de sustancias tóxicas o potencialmente tóxicas, con fines no terapéuticos. Sin embargo, México vive en este momento un proceso de mayor infiltración en drogas de abuso a todos los niveles, lo que da origen a uno de los más graves problemas de la actualidad, por el uso de una o más sustancias psicoactivas, que pueden ser prescritas por el Médico o adquiridas de manera ilícita y en la mayoría de los casos el consumo condiciona daño a la salud física o mental, que influyen en todas las esferas de la vida del sujeto que las consume, desencadenando delitos, accidentes, suicidios, desintegración familiar, ausentismo laboral, disminución en la productividad, entre otros; incrementando un importante problema de Salud Pública en nuestro país. Este problema de la drogadicción es universal y prácticamente no existe nación que no se vea afectada de alguna manera por el abuso de sustancias que causan dependencia, lo mismo las de consumo lícito como el alcohol, el tabaco y los medicamentos psicotrópicos como las de uso ilegal que afectan la conducta, en las personas que las consumen. ^{1,2}

3.2. Relación de las benzodiazepinas en hechos delictivos.

El consumo de drogas psicoactivas y las conductas antisociales son dos hechos íntimamente ligados entre sí. Existe una estrecha vinculación entre el incremento de los hechos delictivos y el aumento del consumo de drogas. Este tipo de fármacos como por ejemplo el Rofinol (flunitrazepam, nombre del principio activo) se utilizaron para cometer delitos entre los cuales resaltan el asalto sexual, accidentes automovilísticos así como asalto a clientes asiduos a centros nocturnos para despojarlos de sus pertenencias.^{1,2}

En fechas recientes el Valium y el Rofinol son drogas ó fármacos que se han utilizado para realizar delitos de asalto sexual en casos de violación, este tipo de medicamentos que se utilizan para cometer cierto tipo de delitos son las benzodiazepinas, tales como el Clordiazepóxido, Diacepam y Lorazepam por mencionar algunos, que por sus características sedantes y generadoras de amnesia, además de su poco sabor y olor, estas sustancias se han utilizado como “drogas de asalto sexual” para cometer abusos sexuales, principalmente de mujeres, ya que bajo sus efectos la víctima ofrece menos resistencia al ataque. El Rohypnol es un tranquilizante, diseñado originalmente como medicina antidepresiva y contra la ansiedad, que pertenece a la familia de las benzodiazepinas (como el Valium y el Librium). Al principio reduce la ansiedad, y luego provoca sueño, dificultad al hablar y moverse (porque induce desde relajación hasta pérdida total del control muscular); puede ocasionar confusión, depresión, alteraciones respiratorias, lagunas mentales que duran más de 24 horas, amnesia y, en algunos casos, extrema agresividad. Este tipo de drogas se obtienen fácilmente, debido a que muchas recetas son falsificadas o robadas, estos medicamentos requieren de su receta médica para realizar su venta ya que pertenecen a Psicotrópicos del grupo II, clasificado por la Ley General de Salud (LGS) en su artículo 245 y el 251 del Reglamento de Insumos para la Salud.^{3,4,5}

3.3. Descripción de las propiedades físicas y químicas de las benzodiazepinas.

Las benzodiazepinas son un grupo farmacológico relativamente extenso, con variedad de efectos e indicaciones, cuyo auge en el mercado farmacológico mundial es preciso tener en cuenta. No sólo son los psicofármacos mas ampliamente utilizados a lo largo del planeta, sino quizás uno de los grupos farmacológicos de mayores ventas entre la amplia diversidad de opciones terapéuticas de cualquier índole. Desde que en 1960 se introdujo en el mercado el clordiazepóxido, seguido un año después por el diazepam, esta gran familia no ha dejado de crecer. ^{6,7}

En 1970 existían en nuestro país ocho fármacos de este grupo; seis de ellos de acción prolongada (clordiazepóxido, diazepam, cloracepato, fluracepam, pracepam y flunitracepam) y tan solo dos de acción corta (oxacepam y triazolam). En 1980 el panorama español arrojaba un total de 17 benzodiazepinas comercializadas, trece de acción prolongada y cuatro de acción corta. Pasada una década, en 1990, eran 26 benzodiazepinas las existentes en el mercado español, habiéndose incrementado notablemente las de acción corta, que ya sumaban once distintas, mientras que las de acción prolongada habían aumentado sólo en dos nuevas, alcanzando la cifra de 15 diferentes. En esta última fecha tan sólo se hallaban comercializadas en los Estados Unidos de América doce benzodiazepinas distintas (cinco de ellas de acción prolongada y siete de acción corta), en el (cuadro I) se describen algunos datos farmacocinéticos de estas benzodiazepinas; lo que puede dar una idea del crecimiento desmesurado que ha tenido en España este grupo farmacológico. ^{6,7}

CUADRO I. Datos farmacocinéticos de algunas benzodiazepinas. ⁷

FARMACO	VIDA MEDIA DE ELEIMINACIÓN EN HORAS.	USO CLÍNICO	METABOLITO ACTIVO
Clordiazepóxido	7-28	Ansiolítico	SI
Diazepam	20-90	Ansiolítico	SI
Cloracepato	50-100	Ansiolítico	SI
Fluracepam	50-100	Hipnótico	SI
Pracepam	30-120	Ansiolítico	SI
Flunitracepam	15-30	Hipnótico	SI
Loracepam	10-20	Ansiolítico	NO
Temacepam	10-20	Hipnótico	NO
Oxacepam	3-21	Ansiolítico	NO
Triazolam	3-5	Hipnótico	NO

Dos nuevos datos cabría añadir a los expuestos: por un lado que del 10 al 17% de la población de países occidentales reconocían, mediada la década de 1970, consumir benzodiazepinas al menos una vez al año, y que una conocida presentación comercial del diazepam era, hasta 1977, el medicamento de cualquier tipo más vendido en todo el mundo. Por otro lado hay que señalar, dentro ya del campo de las intoxicaciones, que las benzodiazepinas son un de los grupos farmacológicos que con mayor frecuencia se utilizan como medio de "intento de suicidio", tanto en nuestro país como en muchos otros como por ejemplo España se hace referencia a este país ya que en México no se han reportado datos sobre el consumo de benzodiazepinas y ya que tenemos un ritmo de vida parecido al de España es por esta razón que se documentan estos datos en los cuales se menciona que un 50% del total de las intoxicaciones reportadas por psicofármacos que fueron atendidas por el Servicio de Información Toxicológica de España ocurrieron durante el periodo comprendido entre 1983 y 1987, se ha reportado un disminución porcentual que oscilaron entre un 62.7% de 1984 hasta un 52.6% en 1987, sin descartar que aún siguen consumiendo este tipo de fármacos ya que son de fácil administración y frecuente prescripción, reducidos precios en general y amplias posibilidades terapéuticas, y por todas estas razones son el grupo de psicofármacos que con mayor frecuencia se ve envuelto en casos de intoxicación, tanto voluntaria como accidental, e incluso utilizadas, si no con fines homicidas, si como medio para cometer delitos, previa administración a incautas víctimas. ^{7, 8, 9}

Las benzodiazepinas se encuentran formadas por una estructura común para todas ellas a las que se agregan diferentes radicales. (cuadro II). Esa estructura común se halla compuesta por un anillo de benceno, unido a otro de diazepina de siete miembros. (fig.1.1). Casi todas las benzodiazepinas de importancia (entre las más de 2000 que se han sintetizado hasta el momento), sin embargo, tiene una sustitución 5-arilo en el segundo anillo de benceno, y un anillo 1,4-diazepina. Sobre esta estructura genérica se han introducido multitud de variantes, como pueden ser la sustitución del anillo bencénico por otras estructuras heteroaromáticas como el tieno o pirazolo; anillos triazólicos o imidazólicos en los radicales 1 ó 3, etc. Todo ello redundando en modificaciones de la actividad principal e incluso en la mayor o menor potencia del fármaco. Así, los grupos aceptores de electrones en posición 2 en el segundo anillo bencénico aumentan la potencia, mientras que los sustituyentes en cualquier otro lugar disminuyen la actividad. En el flumazenil (derivado benzodiazepínico, antagonista de las mismas) son importantes características estructurales la sustitución del segundo anillo bencénico por una función ceto en posición 5 del anillo diazepínico, y un sustituyente metilo en la posición 4. ^{7, 8, 9}

Fig. 1.1 Estructura básica de las benzodiazepinas ^{10, 11}



Cuadro II. Benzodiazepinas y sus diferentes radicales los cuales se sustituyen en la estructura básica para formar otras. ^{10, 11}

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
DIACEPAM	-CH ₃	=O	-H	-H	-Cl
TEMACEPAM	-CH ₃	=O	-OH	-H	-Cl
OXACEPAM	-H	=O	-OH	-H	-Cl
MEDACEPAM	-CH ₃	-H ₂	-H	-H	-Cl
PRACEPAM	-CH ₂	=O	-H	-H	-Cl
NITRACEPAM	-H	=O	-H	-H	-NO ₂
LORACEPAM	-H	=O	-OH	-Cl	-Cl
FLURACEPAM	-(CH ₂) ₂ N (C ₂ H ₅) ₂	=O	-H	-F	-Cl

3.4. Farmacología de las benzodiazepinas.

Estos fármacos deben de sufrir una serie de cambios para ser eficaces; y de igual forma, para ser eliminados del organismo. Los pasos a seguir consisten en: absorción, distribución, biotransformación y excreción del fármaco. Cuando se utilizan para tratamientos de ansiedad o en trastornos del sueño; esta clase de fármacos hipnótico-sedantes, por lo general, se administran por vía oral; sus velocidades de absorción dependen de una diversidad de factores.¹²

La vía de administración habitual es la oral, por que estas se absorben bien, aunque no todas con la misma rapidez alcanzando su concentración máxima entre 1 y 4 horas después de su administración por ejemplo el diazepam, se absorbe considerablemente más deprisa que el clordiazepóxido, el oxacepam o el lorazepam. Estas benzodiazepinas son fármacos débilmente básicos, de esta forma se absorben con mayor eficacia debido al pH al que son expuestos en el duodeno así como lipofilicidad facilitando la velocidad de absorción de estas benzodiazepinas por vía oral.^{12, 13}

Por otra parte; la absorción de las benzodiazepinas depende del fármaco por ejemplo la absorción del Diazepam, así como del flunitrazepam es muy rápida, alcanzando valores máximos entre 30 a 60 min y de 2 horas respectivamente. Así la absorción del triazolam administrado por vía oral es en extremo rápida, mientras que el metabolito activo del cloracepato es más rápido que otras benzodiazepinas usadas comúnmente. El cloracepato se transforma en su forma activa, desmetildiazepam, por la hidrólisis ácida en el estomago (pH 1 a 2), mientras que los demás permanecen intactos hasta que llegan al pH alcalino del intestino. El oxacepam y el temacepam son absorbidos a menor velocidad que otras benzodiazepinas. Es posible que la biodisponibilidad de varias benzodiazepinas, incluyendo clordiazepóxido y diazepam, no sea confiable después de su inyección intramuscular ya que es deficiente e irregular, esto se le atribuye probablemente al factor limitante de la solubilidad del fármaco a pH fisiológico y su posible precipitación en el sitio de la inyección.^{14, 12, 13}

La distribución y transporte de un sedante-hipnótico es la sangre ya que es el vehículo por el cual la mayoría de los fármacos se desplaza a todos los órganos y compartimientos de líquidos, mediante un proceso dinámico, en el cual las moléculas del fármaco entran y salen de los tejidos a velocidades que dependen del flujo sanguíneo. La solubilidad en los lípidos es primordial para determinar la

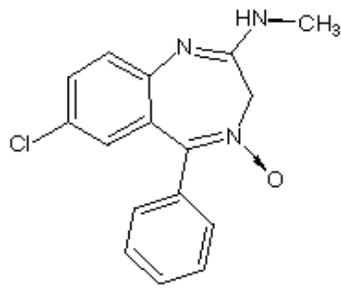
velocidad a la que un sedante-hipnótico penetra en el Sistema Nervioso Central. La redistribución del fármaco a partir del Sistema Nervioso Central a otros tejidos es una característica importante de la biodisposición de los sedantes hipnóticos, estos procesos contribuyen a la terminación de sus principales efectos en el SNC este; también puede ser el caso de otros sedantes hipnóticos, incluyendo las benzodiacepinas.^{12, 13}

Las benzodiacepinas y la mayoría de los sedantes hipnóticos se fijan fuertemente a las proteínas plasmáticas, en general son muy liposolubles, atravesando fácilmente, lo mismo que algunos de sus metabolitos por ejemplo, la fijación de las benzodiacepinas a la albúmina plasmática oscila entre un 60 y 95 %. El tiempo que tardan en llegar al sistema nervioso central es variable siendo el propio diazepam uno de los primeros en producir efectos centrales, puesto que solo moléculas del fármaco libre (no fijadas) tiene acceso al SNC.^{12, 13}

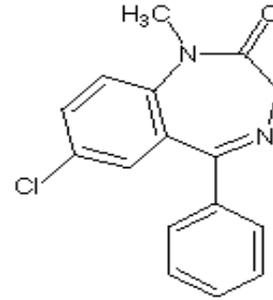
Dada su liposolubilidad, las benzodiacepinas no son directamente excretables por el riñón debiendo metabolizarse, los derivados finalmente excretados son en su mayor parte conjugados con ácido glucorónico o con sulfato.¹³

Algunas benzodiacepinas (en general las que tienen oxhidrilos en su molécula), pueden ser directamente conjugadas y, por ello, su vida media es corta, pero otras han de ser transformadas antes de ser conjugadas (fig. 1.2). Las reacciones de transformación más características son las hidroxilaciones y las desalquilaciones (muchas veces demetilaciones). Muchos de los metabolitos son activos y algunos, particularmente los desalquilados, tienen vidas medias largas, en ocasiones superiores al fármaco original. El metabolismo condiciona, la farmacocinética de las benzodiacepinas, y por ello es muy variable: la vida media del diazepam varia de 14 a 100 horas y la de su metabolito activo N-desmetil-diazepam de 36 a 200 horas; la del oxacepam de 4 a 24 etc.¹²

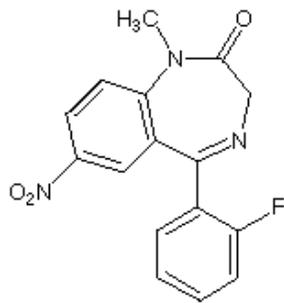
Fig. 1.2 Estructuras de algunas benzodiazepinas. ¹⁵



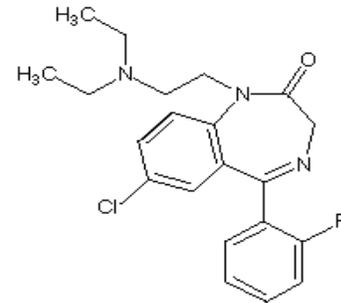
Clordiazepóxido



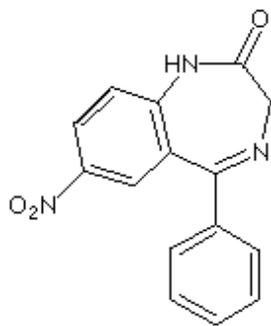
Diazepam



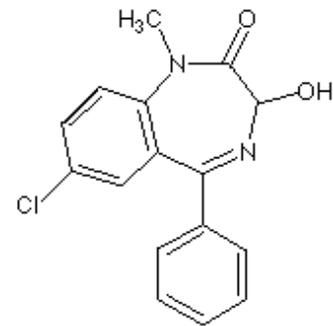
Flunitrazepam



Flurazepam



Nitrazepam



Temazepam

Tras la administración oral de las benzodiazepinas estas alcanzan un pico de 1 a 4 horas en niveles sanguíneos, estas son absorbidas rápidamente fijándose a las proteínas plasmáticas, la fijación a proteínas depende de la benzodiazepina por ejemplo el Alprazolam se fija en un 80% mientras que el Diazepam un 98%. El Cloracepato es hidrolizado en el estómago a N-desmetil-diazepam, un metabolito activo y persistente. El Loracepam y el oxacepam, ambos de acción corta, son excretados como con jugados glucorónidos.¹²

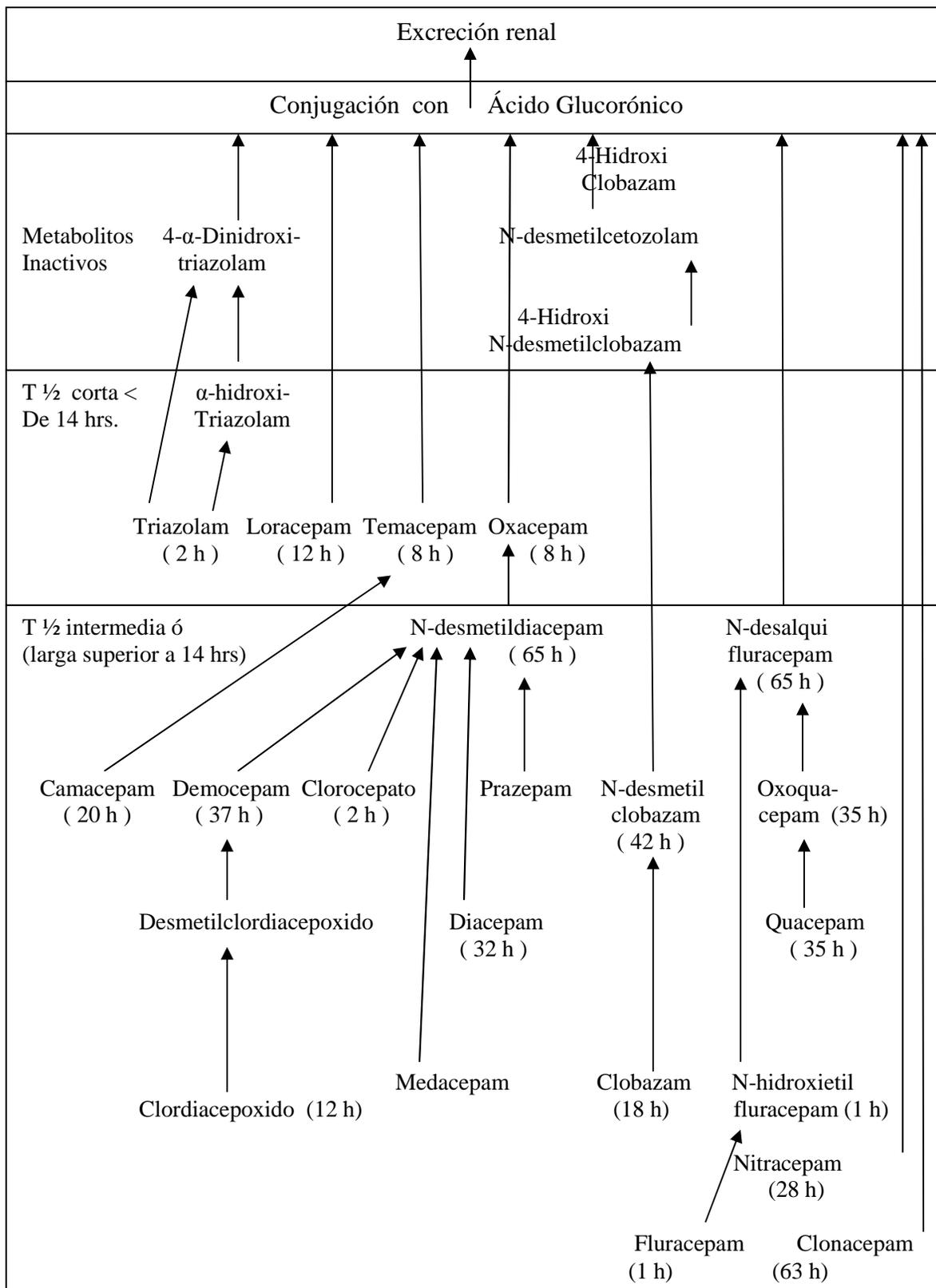
Después de ser absorbidos y distribuidos, inmediatamente el fármaco pasa por primera vez al hígado realizando un metabolismo sustancial, inclusive antes de llegar a la circulación sistémica, debido a la concentración sanguínea del fármaco activo disminuye y la producción de muchos metabolitos inactivos, se eliminan con lentitud. Los sistemas microsomales del hígado que participan en la metabolización de los medicamentos son los que contribuyen en la depuración o eliminación de todas las benzodiazepinas. Como ya se mencionó con anterioridad, la mayoría de los compuestos benzodiazepínicos sufren una reacción de conjugación a través de las enzimas glucorinil transferasas para producir compuestos hidrosolubles como glucorónidos. Los metabolitos hidrosolubles de las benzodiazepinas y otros sedantes hipnóticos se excretan principalmente por los riñones eliminándolos principalmente por la orina.¹³

Como se mencionó antes, la redistribución a tejidos del cerebro puede ser tan importante como la biotransformación para suspender los efectos en el SNC de muchos de los sedantes hipnóticos, en la fig.1.3 se muestra la biotransformación de algunas benzodiazepinas. Sin embargo, es necesaria la transformación metabólica o metabolitos más hidrosolubles para la depuración final de casi todos los fármacos de esta clase. Los sistemas enzimáticos microsomales, que metabolizan fármacos en el hígado son de gran importancia en este sentido. Puesto que pocos sedantes hipnóticos se excretan sin cambios, la vida media de eliminación depende principalmente de su transformación metabólica.¹⁶

El metabolismo de las benzodiazepinas se lleva a cabo por dos vías principales conocidas como reacciones de fase I y de fase II en las fig.1.3; la reacción de fase I, es aquella donde interviene la oxidación microsomal, incluye una N-desalquilación o una hidroxilación alifática. Mientras que las reacciones de fase II incluyen la conjugación del fármaco por las enzimas glucorinil transferasas dando lugar a la formación de glucorónidos, ácidos sulfónicos o ácidos glucorónicos, que son

excretados en la orina. De esta forma la característica más importante en el metabolismo de las benzodiazepinas, es la formación de metabolitos activos que causan efectos sobre el SNC (sistema nervioso central). Sin embargo, muchos metabolitos de las benzodiazepinas son activos, con vida media más prolongada que la de los fármacos originales. Como por ejemplo el desmetildiazepam, que tiene vida media de eliminación de 40 a 140 horas, es un metabolito activo del clordiazepóxido, diazepam, prazepam y cloracepato. El desmetildiazepam a su vez es biotransformado al compuesto activo oxacepam. Otros metabolitos activos del clordiazepóxido son el desmetilclordiazepóxido y el demoxepam. Aunque el diazepam es metabolizado principalmente a desmetildiazepam, también es transformado a temazepam que posteriormente es metabolizado en parte a oxacepam. El flurazepam, que se utiliza de manera primordial para hipnosis, es oxidado por enzimas hepáticas a tres metabolitos activos, desalquilflurazepam, hidroxietilflurazepam y flurazepam aldehído, cuyas vidas medias de eliminación van de 30 a 100 horas. Esto puede dar por resultado una depresión indeseada del SNC, incluyendo sedación durante todo el día.¹⁷

Fig. 1.3 Biotransformación metabólica de distintas benzodiazepinas. ¹⁸



Aquellas benzodiazepinas para las cuales el fármaco precursor a los metabolitos activos tiene vidas medias prolongadas presentan mayor probabilidad de producir efectos acumulativos con dosis múltiples. Los efectos acumulados y residuales, como la somnolencia excesiva; parecen ser menores con fármacos como el oxacepam y el loracepam, que tienen vidas medias más cortas y son metabolizados directamente a glucurónidos inactivos. (cuadro III).¹⁷

La mayor parte de las benzodiazepinas, incluidos el clordiazepóxido y el diazepam, las metaboliza el sistema microsomal hepático para formar compuestos activos, los metabolitos hidrosolubles de las benzodiazepinas y otros sedantes hipnóticos se excretan principalmente en la orina como glucurónidos o metabolitos oxidados.¹⁹

Cuadro III. Las benzodiazepinas y sus metabolitos activos después de su metabolismo.¹²

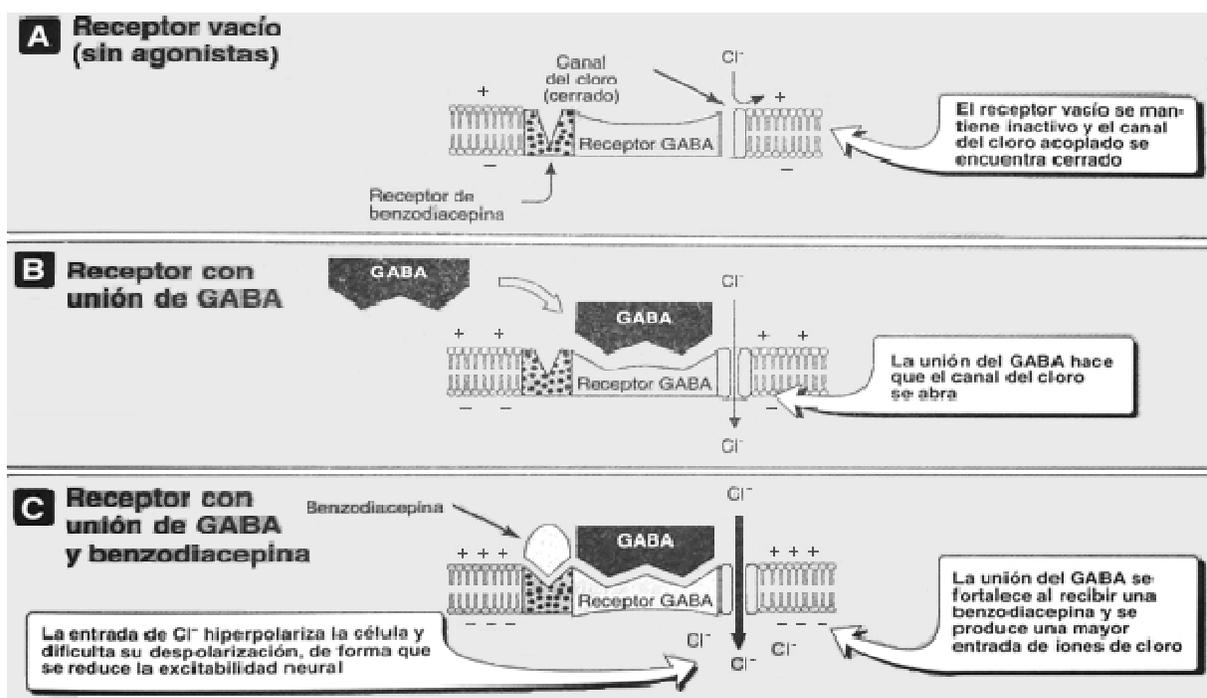
Fármaco	Metabolitos
Clordiazepóxido	Activos: demoxepam, oxacepam.
Diazepam	Activos: desmetildiazepam, temaxepam, oxacepam.
Flunitrazepam	Activo: desmetilflunitrazepam
Flurazepam	Activos: derivados desalquilo y otros
Clorazepato	Activos: desmetildiazepam, oxacepam
Alprazolam	Activo: α - hidroxialprazolam

El metabolismo hepático es el encargado de la depuración o eliminación de todas las benzodiazepinas. Al terminar la biotransformación del principio activo, da comienzo el proceso de excreción de los metabolitos. Así que cuando los fármacos son solubles en agua o se hacen hidrosolubles por el metabolismo, como es en el caso de las benzodiazepinas, estos se eliminan del cuerpo por medio de la orina. La mayoría de las benzodiazepinas sufren oxidación microsomal, incluyendo N-desalquilación e hidroxilación alifática. Los metabolitos son conjugados subsecuentemente por glucoronil transferasas para formar glucurónidos, que son excretados en la orina.¹²

3.5. Mecanismo de acción de las benzodiazepinas.

Las benzodiazepinas se unen a sitios en la membrana con gran afinidad y especificidad por sus moléculas, que están separados de los receptores del ácido gamma aminobutírico (GABA) pero que son contiguos a estas estructuras. Los receptores de benzodiazepinas se localizan sólo en el Sistema Nervioso Central, en las regiones que contienen neuronas que usan el ácido gamma aminobutírico (GABA) como neurotransmisor. La unión de las benzodiazepinas incrementa la afinidad de los receptores ácido gamma aminobutírico (GABA) por esta sustancia y esto propicia una abertura más frecuente de los canales cloro adyacentes (véase figura 1.4), la unión del ácido gamma aminobutírico (GABA) a su receptor en la membrana celular desencadena la abertura de un canal del cloro, hecho que da lugar a un incremento de la conductancia del cloro causando que el flujo de los iones cloro migren hacia el interior de la célula provocando una hiperpolarización leve, inhibiendo la actividad neuronal.^{19, 20}

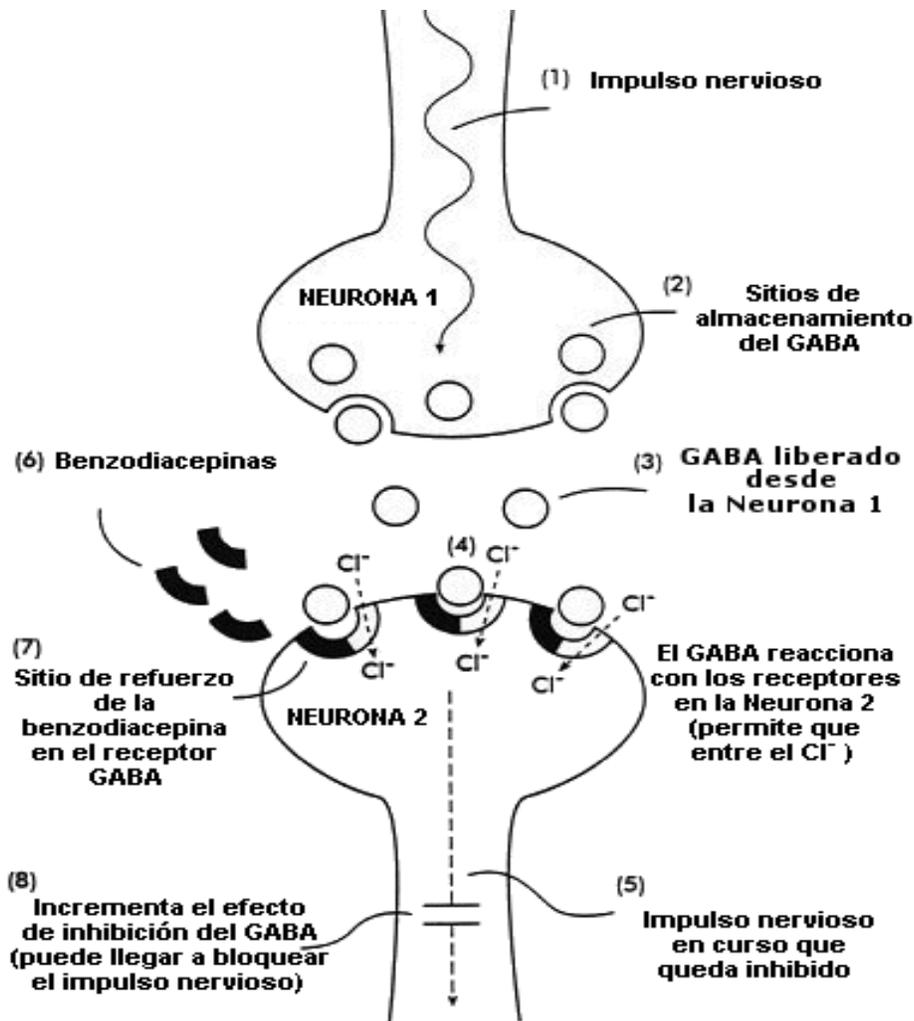
Fig. 1.4 Diagrama esquemático el complejo benzodiazepina-GABA-canal de los iones de cloruro. GABA, ácido aminobutírico gamma.¹⁹



La forma en que el GABA transmite su mensaje inhibitorio es a través de lo que podríamos llamar un inteligente dispositivo electrónico. Su reacción con los sitios especiales (receptores GABA) ubicados en la parte exterior de la neurona que lo recibe abre un canal, permitiendo así que las partículas con carga negativa (iones de cloruro) entren en la neurona. Estos iones negativos "sobrecargan" la neurona, debilitando la respuesta de la misma a otros neurotransmisores que, en condiciones normales, la excitarían. Las benzodiazepinas también reaccionan en sus propios sitios especiales (receptores benzodiazepínicos) que precisamente están ubicados en los receptores GABA. La combinación de una benzodiazepina con su receptor potencia la acción del GABA, lo cual permite que entren en las neuronas mayor cantidad de iones de cloruro, aumentando así la resistencia de la neurona a la excitación. Los distintos subtipos de receptores benzodiazepínicos tienen acciones levemente distintas. Uno de estos subtipos, (el alfa 1) es el responsable de los efectos sedativos, otro (el alfa 2) es el que ejerce efectos ansiolíticos, mientras que ambos, el alfa 1 y el alfa 2, como también el alfa 5, son los responsables de los efectos anticonvulsivos. Todas las benzodiazepinas se combinan, en mayor o menor grado, con todos estos subtipos y todas aumentan la actividad del GABA en el cerebro.²²

Todas las benzodiazepinas actúan aumentando la acción de una sustancia química natural del cerebro, el GABA (ácido gamma-aminobutírico). El GABA es un neurotransmisor, es decir, un agente que transmite mensajes desde una célula cerebral (neurona) hacia otra. El mensaje que el GABA transmite es un mensaje de inhibición: le comunica a las neuronas con las que se pone en contacto que disminuyan la velocidad o que dejen de transmitir. Como más o menos el 40% de los millones de neuronas del cerebro responden al GABA, esto significa que el GABA tiene un efecto general tranquilizante en el cerebro: de cierta forma, es el hipnótico y tranquilizante natural con que cuenta el organismo. Las benzodiazepinas aumentan esta acción natural del GABA, ejerciendo de esta forma una acción adicional (frecuentemente excesiva) de inhibición en las neuronas (Fig. 1.5).²²

Fig. 1.5 Diagrama del mecanismo de acción del neurotransmisor natural GABA (ácido gamma-aminobutírico) y de las benzodiacepinas en las células del sistema nervioso (neuronas) en el cerebro. ²¹



- (1,2) Impulso nervioso que hace que el GABA sea liberado de los sitios en que está almacenado en la neurona 1.
- (3) El GABA liberado en el espacio interneuronal.
- (4) El GABA reacciona con los receptores de la neurona 2; la reacción permite la entrada de los iones de cloruro (Cl^-) en la neurona.
- (5) Este efecto inhibe o detiene el progreso del impulso nervioso.
- (6,7) Las benzodiacepinas reaccionan con el sitio de refuerzo de los receptores GABA.
- (8) Esta acción aumenta los efectos inhibidores del GABA; el impulso nervioso en curso puede quedar bloqueado completamente.

Como resultado de este incremento de la actividad inhibidora del GABA causada por las benzodiazepinas, disminuye la producción cerebral de neurotransmisores excitativos, incluso se reduce la producción de norepinefrina (noradrenalina), serotonina, acetil-colina y dopamina. Estos neurotransmisores excitativos son necesarios para las funciones involucradas en el estado normal de vigilia y alerta, memoria, tono muscular y coordinación, respuestas emocionales, secreciones de las glándulas endocrinas, control del ritmo cardíaco y de la tensión sanguínea y para muchas otras funciones, todas las cuales pueden ser perjudicadas por las benzodiazepinas. ²²

La elevada concentración de receptores en la corteza cerebral, hipocampo y amígdalas, podría explicar el efecto anticonvulsivo, mientras que los receptores de la formación reticular y de otras estructuras del puente y la médula oblonga probablemente estén relacionados con las acciones sedantes. Los efectos clínicos de las benzodiazepinas se correlacionan con la afinidad que cada una tiene por los complejos GABA-canal del cloro. ²⁰

Hay indicadores biológicos, incluyendo (sangre, orina, pelo y saliva) estos son los principales fluidos biológicos que se utilizan para la detección de drogas en el laboratorio toxicológico. En este caso la orina se mantiene como el parámetro biológico de elección para la detección cualitativa de uso ilegal de drogas. ²³

Una droga puede detectarse en un líquido corporal pero existen limitaciones prácticas que rigen que muestras pueden ser, y son usadas. La elección del indicador biológico esta influenciada por la farmacocinética de la sustancia a detectar, y la facilidad con que pueda analizarse en el laboratorio. Esto es el tiempo en que podemos encontrar la droga en el organismo en función del proceso metabólico del toxico, este podría aparecer en los fluidos o tejidos en su forma original o como un producto de transformación (metabolito). Es así como se determina, en este caso la orina es el indicador biológico es el más adecuado para determinar la presencia de metabolitos de benzodiazepinas. ⁷

3.6. Metodología y técnicas presuntivas para identificación de benzodiazepinas.

En los últimos años se ha observado un importante incremento en el consumo de drogas de abuso lo que ha traído un incremento en el análisis de estas drogas en fluidos biológicos. Existen diferentes métodos para la identificación de drogas de abuso, los métodos que se utilizan con frecuencia son métodos colorimétricos, técnicas inmunoquímicas y técnicas cromatográficas, el procedimiento o técnica que se decida utilizar dependerá del laboratorio de acuerdo a sus posibilidades económicas, claro que se han empleado muchas técnicas metodológicas para el estudio en muestras de orina.^{7,10}

En cuanto a los métodos coloridos, son cualitativos, pueden ser de tal sencillez que permitan su ejecución fuera del laboratorio. En otras ocasiones requiere un lugar, un especialista idóneo y experto en la interpretación de resultados, para el caso de la identificación de benzodiazepinas sólo se reporta el uso de la prueba Bratton Marshall en muestras de orina esta prueba determina a un sólo fármaco de la gran familia de la benzodiazepinas el nitrazepam el cual puede ser directamente determinado aunque claro que no es específica proporcionándonos solo si esta presente o no el fármaco, quizás por esta razón para el caso de la identificación de benzodiazepinas ya no es una prueba asequible ya que como mencionaba solo nos proporciona un resultado positivo o negativo.¹⁰

Otra técnica a la cual se recurre es la Cromatografía en Capa Fina que es particularmente adecuada para cualquier laboratorio, grande o pequeño, por su rapidez, facilidad de operación, buena resolución y especificidad. Esta técnica requiere un equipo y espacio mínimos, no se necesita personal especializado y permite la determinación simultánea de varias muestras. La cromatografía en capa fina puede demostrar la presencia de una droga, pero no puede determinar la cantidad presente además que sólo provee sólo una respuesta positiva o negativa ya que esta técnica es cualitativa al igual que el método colorimétrico por esta razón estas técnicas han sido desplazadas en la actualidad por kits de técnicas inmunológicas que ya existen en el mercado como el EMIT, RIA, FPIA, ELISA etc.⁷

En la actualidad existe gran variedad de técnicas a disposición del toxicólogo que abarcan desde pruebas de reacciones colorimétricas, hasta los métodos instrumentales más sofisticados. Dado el elevado número de técnicas instrumentales existentes sólo se hará referencia a las de mayor utilidad, por esta razón solo nos ocuparemos en técnicas inmunoquímicas o de screening para la identificación de benzodiazepinas en orina como por ejemplo. ⁷

- Radioinmunoanálisis (RIA)
- Inmunoanálisis por fluorescencia polarizada (FPIA)
- Técnica de inmunoensayo multiplicador de enzima (EMIT)
- Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)

Estas pruebas presuntivas son sensibles pero no necesariamente específicas, además, existen métodos de detección rápidos donde los resultados se obtienen a simple vista, sin necesidad de usar costosos equipos automatizados, este tipo de pruebas presuntivas que se utilizan son los inmunoensayos, ya que son los métodos más comunes para identificar el uso ilegal de drogas es por tanto una prueba inicial usando el inmunoanálisis, ya sea la técnica de inmunoensayo multiplicador de enzima (EMIT), el inmunoensayo con polarización fluorescente (FPIA), el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) para clasificar cualquier sustancia presente. La metodología usada para la identificación de benzodiazepinas es la química analítica que permite detectar y confirmar la presencia de sustancias prohibidas. Las técnicas más empleadas para el análisis presuntivo (screening) son equipos de inmunoensayo estas técnicas inmunológicas se basan en la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). ^{23, 24, 25, 26}

Para facilitar los diferentes requisitos necesarios para la detección de drogas en los fluidos biológicos, se han establecido diferentes umbrales (valores de corte), (cuadro IV). Estos valores los establecen organizaciones nacionales como la SAMHSA (Administración de Abuso de Sustancias y Servicios de Salud Mental) en los Estados Unidos y el NEQAS (Plan Nacional para la Valoración de la Calidad Externa) en el Reino Unido. ²³

Cuadro IV. Valores de corte comúnmente recomendados por el Departamento de Salud y Servicios Humanos (HHS) y la Organización de la Valoración de la Calidad Nacional Externa del Reino Unido (NEQAS) para las drogas de abuso. ²³

DROGAS	HHS		UK-NEQAS	
	Niveles de test inicial (mg/L)	Confirmación (mg/L)	Niveles de test inicial (mg/L)	Confirmación (mg/L)
Anfetaminas	1000			
Anfetamina		500	1000	1000
Metanfetamina		500	1000	1000
Barbitúricos	-----	-----	1000	300
Benzodiazepinas	-----	-----	1000	300
Metabolitos	300	150	300	300
Cocaína				
Metabolitos	50	15	65	65
Marihuana				
Metadona			1000	300
Fenciclidina	25	25	-----	-----
Opiáceos	300		1000	-----
Morfina	300		1000	500-1000
Codeína	300		2000	1000-2000
LSD	-----	-----	-----	2.5

Las benzodiazepinas se identifican en pruebas preliminares realizadas en muestras de orina. Actualmente, la orina es el fluido biológico preferido para el análisis de uso de drogas ilegales y sus metabolitos. Mientras la tendencia reciente ha sido aplicar tecnología de laboratorio a nuevos medios biológicos, debería tenerse en cuenta que el análisis de orina es una tecnología bien conocida en la que la mayoría de los problemas han sido descubiertos y resueltos o por lo menos definidos. ²³

La importante ventaja de la orina para los test de detección de drogas es que generalmente esta disponible en cantidad suficiente, es fácil de recoger en diversos medios y las drogas y/o sus metabolitos tienden a estar presentes en concentraciones relativamente altas. Aunque también tiene algunas limitantes. Generalmente el análisis de orina (excepto para cannabis, metadona y diazepam) puede indicar únicamente el uso de drogas en los días previos inmediatos. ²³

Este fluido biológico es fácilmente adulterable con sustancias químicas (lejía, vinagre, jabón líquido etc.) y por lo tanto producir falsos negativos.²³

Las pruebas de toxicológicas para la identificación de drogas esta dividido en dos categorías las pruebas presuntivas y las pruebas de confirmación.

Estas técnicas analíticas son:

- Radioinmunoensayo (RIA)
- Fluoroimunoensayo (FIA o FPIA)
- Enzima inmunoensayo (EIA o MEIA)^{27, 28, 29}

Otras técnicas son las de cromatografía es un proceso de separación de especies entre dos fases (fase móvil y fase estacionaria).

La instrumentación para realizar este tipo de análisis son:

- Cromatografía de gases
- Cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas
- Cromatografía de líquidos de alta resolución
- Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrómetro de masas.^{30, 31, 32}

Claro que estas técnicas e instrumentación se utilizan, no sólo para la identificación presuntiva, sino también para la confirmación de los metabolitos activos de las benzodiacepinas.³⁰

3.7. Fundamentos de los métodos.

Las técnicas instrumentales que se utilizan para la identificación de drogas en el laboratorio toxicológico son las técnicas o procedimientos inmunoquímicos los cuales utilizan como principio analítico la reacción antígeno-anticuerpo, dado que los antígenos y anticuerpos se definen por sus interacciones mutuas, uno de ellos puede utilizarse para cuantificar al otro utilizando anticuerpos marcados con (fluoresceínas, con radioisótopos o con enzimas) los cuales hacen que estos métodos se empleen ampliamente para la identificación de drogas ilegales, estas técnicas son llamadas inmunológicas, inmunoquímicas ó inmunoensayos este tipo de métodos han proporcionado gran parte de los progresos alcanzados por la biología moderna se deben al perfeccionamiento de los métodos analíticos de medida. Estos procedimientos basados en las reacciones inmunológicas han representado un importante avance en el análisis de sustancias de interés en el laboratorio de toxicología. ⁷

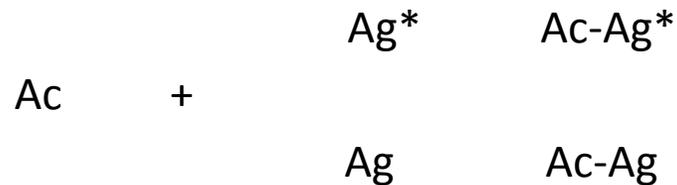
3.7.1. RADIOINMUNOANALISIS (RIA).

Una de las técnicas más sensibles para detectar antígeno o anticuerpo es el radioinmunoensayo (RIA). La técnica la desarrollaron en 1960 dos endocrinólogos, S.A. Berson y Rosalyn Yalow, para determinar las concentraciones de complejos de insulina y antiinsulina en diabéticos. Aunque su técnica se recibió con cierto escepticismo, pronto demostró su valor para medir hormonas, proteínas séricas, fármacos y vitaminas a concentraciones de 0.001 microgramos por mililitro o menos.

33

El principio del RIA incluye la unión competitiva de antígeno radiomarcado y antígeno no marcado a un anticuerpo de alta afinidad, el antígeno marcado se mezcla con anticuerpo a una concentración que satura los sitios de unión de antígeno del anticuerpo. En seguida se añaden en cantidades crecientes las muestras de antígeno no marcado de concentración desconocida, el anticuerpo no distingue el antígeno marcado del no marcado, por lo que los dos tipos de antígeno compiten por los sitios de unión disponibles en el anticuerpo; conforme la concentración de antígeno no marcado aumenta, más antígeno marcado se desplaza de los sitios de unión. La disminución de la cantidad de antígeno radiomarcado que se une al anticuerpo específico en presencia de la muestra en

estudio se mide para determinar la cantidad de antígeno que esta última contiene, este sistema radioinmunológico descrito puede esquematizarse como una interacción reversible combinada: ³³



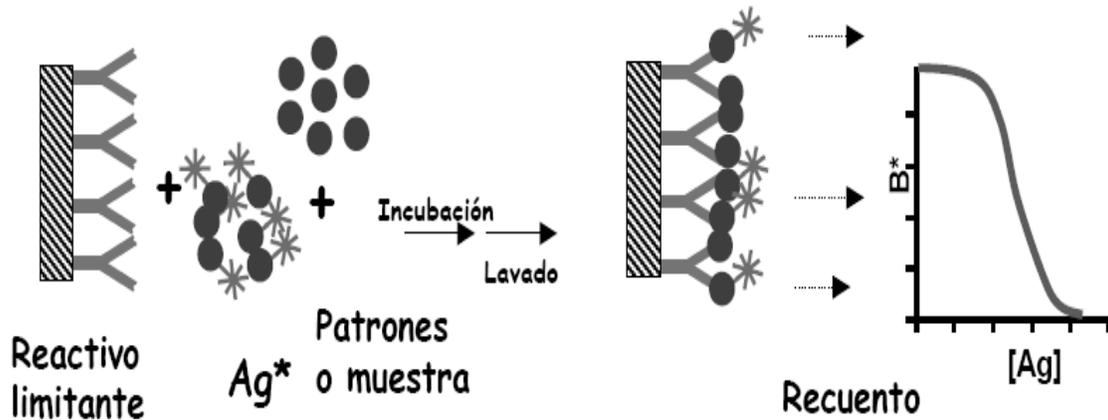
Donde Ac representa el anticuerpo específico; Ag* es el antígeno marcado (trazador) libre; Ag es el antígeno libre no marcado de las soluciones patrones o de las muestras desconocidas; Ac-Ag* es el complejo soluble entre el anticuerpo y el antígeno marcado, y Ac-Ag es el complejo soluble con el antígeno no marcado. ³³

El proceso obedece a la ley de acción de masas, y además la distribución del trazador dentro del antígeno total es indiscriminable por medio del anticuerpo, de modo que cuanto mayor sea la cantidad de antígeno no marcado presente, menor será la cantidad de trazador que se una al anticuerpo. Bajo este principio se puede determinar la concentración del antígeno en muestras complejas de fluidos biológicos con suficiente sensibilidad y especificidad si se cumplen los siguientes requisitos:

1. El trazador es altamente radiactivo y por lo tanto puede colocarse en concentraciones infinitesimales, pero cuantificables.
2. El anticuerpo es altamente específico, posee muy alta afinidad y se halla en baja concentración. La justificación teórica y el ajuste de las condiciones experimentales en relación con estos postulados se enuncian formalmente más adelante. ³⁴

Dado que los antígenos y anticuerpo se definen por sus interacciones mutuas, uno de ellos puede utilizarse para cuantificar al otro. En la fig. 1.6 se muestra el diagrama del radioinmunoanálisis.

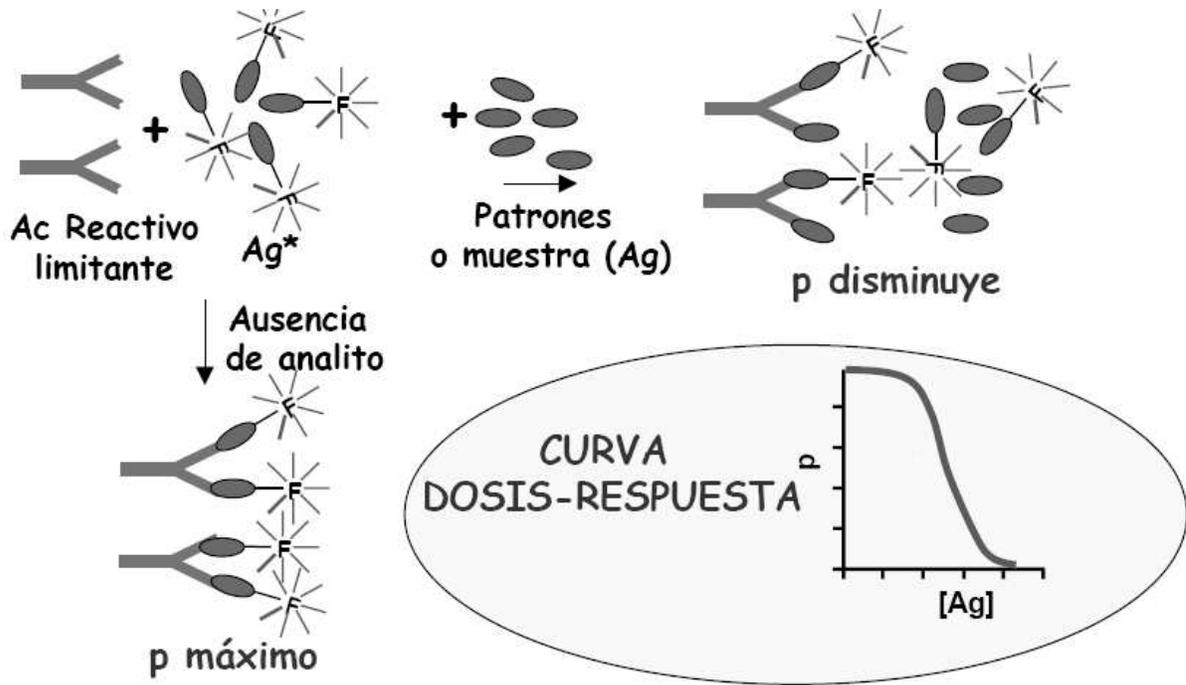
Fig. 1.6 Técnica de Radioinmunoanálisis (RIA)



3.7.2. INMUNOANÁLISIS POR FLUORESCENCIA POLARIZADA (FPIA).

Este inmunoensayo de polarización fluorescente está basado en el principio de unión competitiva, el antígeno de la muestra compite con el antígeno marcado con fluoresceína por un número limitado de puntos de unión de los anticuerpos. Cuando se utiliza luz polarizada lineal para excitar al antígeno marcado con fluoresceína, que es pequeño y gira rápidamente en solución, se despolariza significativamente la luz emitida, cuando el antígeno marcado con fluoresceína se une al anticuerpo, el giro se vuelve más lento y la luz polarizada lineal de excitación se mantiene altamente polarizada tras la emisión. La cantidad elevada de antígeno sin marcar en la muestra provocará una unión menor del antígeno marcado con fluoresceína por el anticuerpo, y una menor polarización de la luz emitida desde la muestra, se utiliza para proporcionar una medición exacta y sensible de pequeños analitos como pueden ser las drogas terapéuticas, drogas de abuso, y algunas hormonas, en la figura 1.7 se ilustra la FPIA.³⁴

Fig. 1.7 Técnica de Inmunoanálisis por Fluorescencia Polarizada (FPIA)

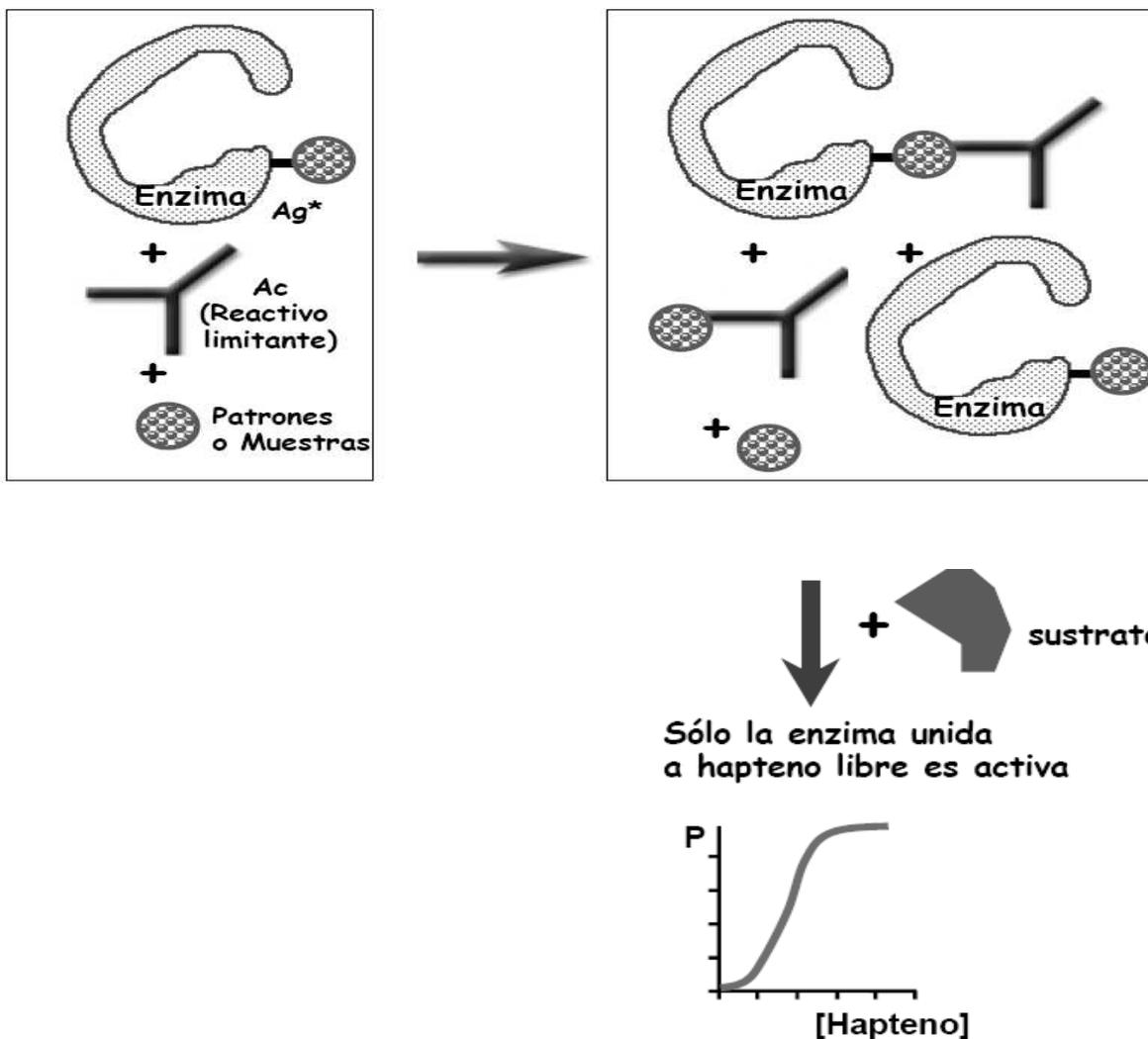


3.7.3. TÉCNICA DE INMUNOENSAYO MULTIPLICADOR DE ENZIMA (EMIT).

Esta técnica es un inmunoensayo donde se mide la actividad de una enzima la cual se inhibe por la unión del anticuerpo al hapteno conjugado con la enzima (antígeno).

En esta técnica competitiva se marca con una enzima la sustancia que se desea determinar. Cuando la sustancia marcada se une a un anticuerpo específico con ella, se producirá la inhibición de la actividad de la enzima, al impedir que el sustrato acceda al centro activo. Para realizar la prueba, se mezcla el espécimen que contiene la sustancia que quiere medirse con una cantidad fija de la sustancia marcada con la enzima y una cantidad limitante de un anticuerpo específico contra la sustancia, en la fig. 1.8 se muestra un diagrama de la técnica. Se produce una competencia entre la sustancia a analizar y la marcada con la enzima por el anticuerpo y la actividad enzimática será mayor. De esta manera, esta actividad es directamente proporcional a la concentración de la sustancia que se analice en el espécimen. ³⁵

Fig. 1.8 Técnica de inmunoanálisis multiplicado por enzimas (EMIT)

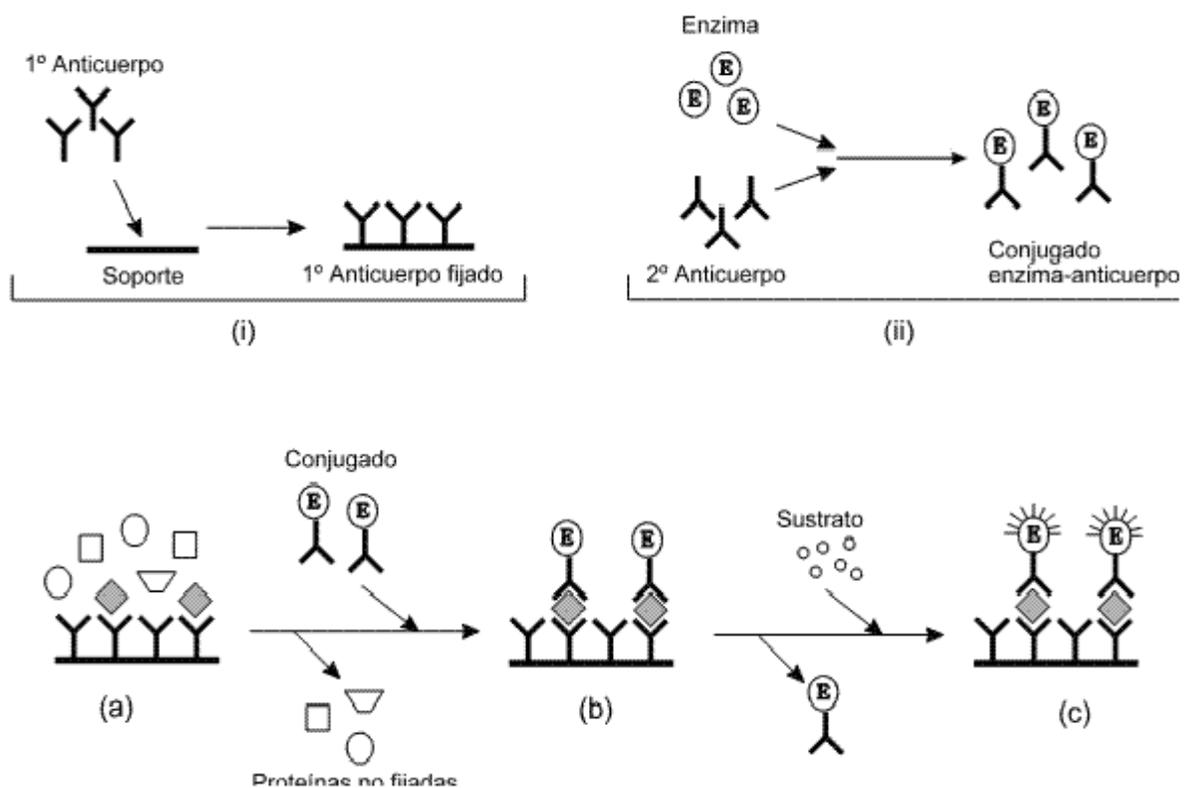


3.7.4. ENSAYO DE INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA).

Esta técnica es un inmunoensayo que permite determinar la concentración de un antígeno un anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación de un complejo antígeno-anticuerpo mediante un trazador enzimático. Las distintas modalidades técnicas de ELISA se pueden clasificar en dos grandes grupos: técnicas no competitivas y competitivas. Cualquiera de estas modalidades puede ser usada para medir niveles de antígeno y de anticuerpo específico en una muestra.³⁴

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima, que suele conocerse como ELISA (o EIA), es similar en principio a la RIA pero depende de una enzima en lugar de un marcador radiactivo, en la fig. 1.9 se ilustra la técnica de ELISA. Una enzima conjugada con un anticuerpo reacciona con un sustrato incoloro para generar un producto con reacción de color. A ese sustrato se le denomina sustrato cromógeno. Estas pruebas tienen una sensibilidad comparable a las de RIA y la ventaja de ser más seguras y menos costosas.³³

Fig.1.9 Técnica de inmunoanálisis ligado a enzima.



Etapas de un ensayo de ELISA. Previamente al comienzo de éste, ha habido que fijar el primer anticuerpo al soporte o pocillo (i) y marcar el segundo anticuerpo con la enzima (ii). El análisis consta de tres etapas: (a) incubación de la muestra con el primer anticuerpo, (b) incubación con el segundo anticuerpo y (c) desarrollo del color mediante una reacción enzimática.

3.7.5. CROMATOGRAFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG/MS).

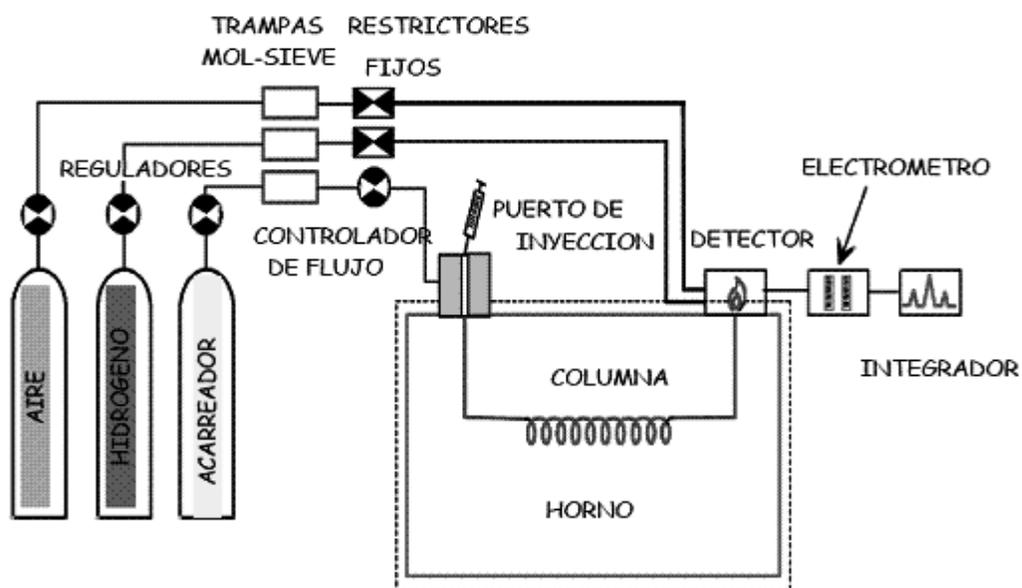
La cromatografía, en general, es un método de separación en el cual los componentes de una muestra son separados como consecuencia de la diferente distribución entre una fase móvil y una fase estacionaria. Las distintas combinaciones de estas fases nos proporcionan las diferentes clases de cromatografía; por ejemplo si la fase móvil es un gas tenemos la cromatografía de gases, (CG), la cual puede ser gas - sólido y gas - líquido según la naturaleza de la fase estacionaria.³⁵

La Espectrometría de Masas es una técnica analítica instrumental de alta sensibilidad capaz de identificar cualitativamente y cuantitativamente, y de forma inequívoca, cualquier tipo de mezclas de sustancias así mismo esta técnica permite; también determinar la masa molecular de un compuesto, así como los diversos fragmentos que resultan de la rotura controlada del mismo dando estos una información muy valiosa sobre la estructura de la molécula, se describe la cromatografía de gases y su acoplamiento con la espectrometría de masas, técnicas que constituyen una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas.³⁵

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato del que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases. Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC ("Gas Chromatography") y MS ("Mass Spectrometry") da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas llamada también cromatografía de gases-espectrometría de masas.³⁶

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma, la idea de esta técnica se basa en la volatilización de la muestra y su posterior inyección en la cabeza de una columna cromatográfica, para la elución de la muestra se usa un gas inerte como fase móvil, de esta manera la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, simplemente transporta el analito a través de la columna, en la fig. 1.10 se detallan los requerimientos de un cromatógrafo de gases: ³⁶

Fig. 1.10 Cromatógrafo de gases.



Los requerimientos básicos en un equipo de cromatografía de gases son:

1. Gas de arrastre o acarreador
2. Puerto de inyección
3. Una columna
4. Un detector
5. Un registrador o cualquier otro dispositivo de salida para medir la señal del detector
6. Cromatograma

Se trata de un método analítico en el que se combinan dos técnicas. Los componentes de las muestras analizadas se separan por cromatografía de gases y se detectan y caracterizan por espectrometría de masas. Los dos equipos están acoplados. Las siglas suelen dejarse en inglés (GC-MS o GC/MS), pero también se ven en castellano (CG-EM o CG/EM). Método de análisis basado en el estudio detallado de los iones que se forman al suministrar energía a una molécula. El espectro de masas es un diagrama de barras en el que la altura indica la abundancia relativa de los distintos iones producidos, que aparecen ordenados en función de su relación masa/carga (m/z) como se muestra en la fig. 1.11.³⁶

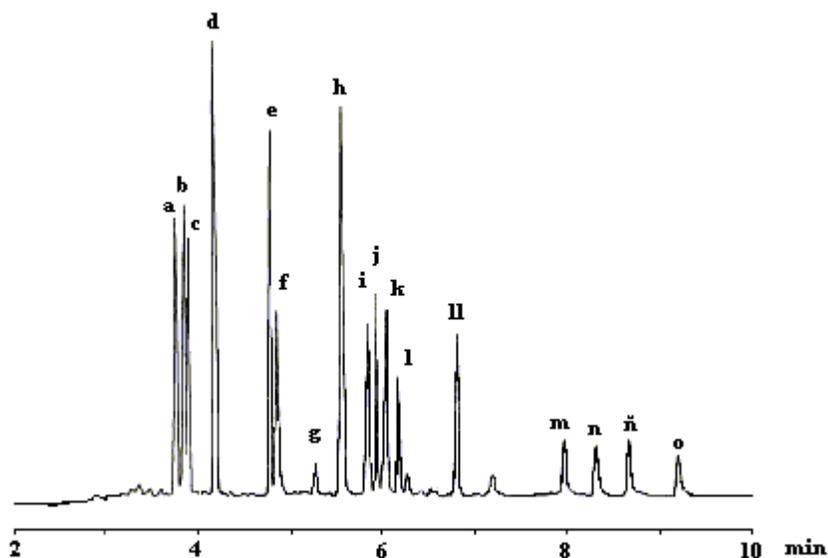


Fig. 1.11 Cromatograma de benzodiazepinas en orina, Identificación de los picos a. Desalquilflurazepam, b. Nordiazepam, c. Halazepam, d. Oxazepam (23), e. Lorazepam (24), f. Diazepam (19), g. Clordiazepóxido (25), h. Temazepam (26), i. Flunitrazepam (20), j. Clonazepam, k. Prazepam, l. 7-Amino- flunitrazepam, ll. N-metilclonazepam (22), m. Alprazolam, n. alfa-hidroxi alprazolam, ñ. Triazolam, o. alfa-hidroxitriazolam.

3.7.6. CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. El (HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY) HPLC o Cromatografía líquida de alta resolución, es una técnica cromatográfica usada para separar componentes empleando una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatográfica. El HPLC es una de las técnicas de laboratorio más utilizada como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos. Básicamente es un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector. Como se muestra en la fig. 1.11 ³⁵

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY) HPLC no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra. Además es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular, el analito se pasa a través de una columna de la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión. La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil y allí se retarda por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna y una vez realizada la separación los componentes pasan al detector y la respuesta de éste es dibujada por un registrador (cromatograma). ³⁵

Teniendo como base consideraciones anteriores, podemos afirmar que las dos técnicas no son excluyentes sino al contrario complementarias y son utilizadas frecuentemente en los análisis forenses como:

- Control de Adulteraciones: Un análisis muy común es el control de licores, determinación de metanol.
- Identificación de Drogas de Abuso: En el establecimiento de las pruebas de tráfico ilícito de drogas se necesitan métodos rápidos y sensibles; generalmente estas drogas se encuentran mezcladas con otras sustancias, lo que hace necesario el análisis selectivo de la materia sospechosa. ³⁵

3.8. Ventajas y desventajas de los inmunoensayos.

Como sabemos todo método o técnica presenta ciertas ventajas y desventajas en este punto se enlistaran las ventajas y desventajas que presentan cada una de estas técnicas para la identificación y cuantificación de drogas, las técnicas que usualmente son usadas para la cuantificación de un tóxico pueden llevar a una interpretación de resultados errónea ya que se pueden producir falsos positivos así como falsos negativos en las pruebas presuntivas o de screening, es por esto que se recomienda siempre realizar pruebas de confirmación para aquellas pruebas que hayan dado un resultado positivo para el tóxico por ejemplo las técnicas de confirmación para la identificación de benzodiazepinas es la Cromatografía de Gases acoplada a Masas (GC-MS) o la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).^{35, 37}

Muchas de las técnicas de inmunoensayo han sido substancialmente automatizadas para realizar rápidamente las pruebas de screening, se realizan sobre muestras simples, normalmente orina, y en la mayoría de los casos se tratan de inmunoensayos que dan un resultado cualitativo acerca de la presencia o ausencia, de un toxico, una limitante quizás de este tipo de pruebas es que sólo se identifica al grupo o familia de toxico por ejemplo; opiáceos, benzodiazepinas, etc., así como también este tipo de técnicas de inmunoensayo los hace susceptibles de presentar falsos resultados tanto positivos como negativos. En la actualidad hay fabricantes de kits de estas técnicas de inmunoensayos que se utilizan como pruebas presuntivas para la identificación de drogas ilícitas, estos kits tienen ciertas características las cuales los hacen accesibles por su eficiencia, sensibilidad y especificidad para la identificación de ciertas drogas ilícitas en muestras de orina obteniendo un resultado binario: positivo o negativo. En el caso del inmunoensayo para la identificación de benzodiazepinas se utiliza el oxacepam como analito frente al cual reaccionan los anticuerpos. Por lo tanto, y teniendo en cuenta la similitud estructural existente entre gran parte de las benzodiazepinas, muchas de ellas van a dar una reacción cruzada y, por lo tanto, un resultado falso positivo, esto lejos de ser un inconveniente, quizás es una ventaja puesto que permitirá detectar un amplio grupo de sustancias que podrían estarse consumiendo, sin olvidar que es necesario realizar una prueba de confirmación después de la prueba preliminar para cuantificar la cantidad de droga. (cuadro V).^{35, 37}

Cuadro V. Sensibilidad, especificidad, eficiencia, falsos positivos y falsos negativos de diferentes técnicas inmunoquímicas para la identificación de benzodiacepinas en orina. ^{38, 39}

Técnica	Sensibilidad %	Especificidad %	Eficiencia %	Falsos positivos	Falsos negativos
EMIT I	89.2	87.0	96.0	13.0	10.8
EMIT II	89.0	100.0	96.0	----	----
ADx	90.5	91.6	----	8.4	9.5
RIA	76.8	93.6	----	6.4	23.2
ONTRAK	79.3	92.2		7.8	20.7
Triage	87.9	89.7	97.0	10.3	12.1
Toxi-lab	23.3	97.4	----	2.6	76.7
REME-di	8.0	100.0	----	0.0	92.0

Tanto las técnicas colorimétricas como la cromatografía en capa fina son técnicas que han sido desplazadas por las técnicas inmunológicas, ya que entre estos tres tipos de técnicas existen ciertas ventajas y desventajas, en el (cuadro VI) se describen algunas ventajas y desventajas generales. ³⁵

Cuadro VI. Ventajas y desventajas generales de técnicas colorimétricas, cromatografía en capa fina y técnicas inmunológicas

TÉCNICA COLORIMETRICA	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS
Determina solo un fármaco	Determina varios fármacos	Determina varios fármacos
Inespecífica	Específica	Específica
Resultado positivo o negativo	Resultado positivo o negativo	Resultado positivo o negativo
Cualitativa	Cualitativa	Cualitativa
No es costosa	No es costosa	No es costosa

Las técnicas inmunoquímicas las cuales ya se han mencionado antes presentan ciertas ventajas y desventajas entre cada una de ellas, las cuales se mencionan en los siguientes cuadros (VII, VIII, IX y X) ^{35, 40}

Cuadro VII. Inmunoensayo RIA ^{35, 40}

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Extremadamente sensible. Adecuada para la detección en gran escala. El procedimiento de conteo se puede hacer de forma automática. Disponible comercialmente	Se utiliza material radiactivo. Los reactivos y la instrumentación son costosos.

Cuadro VIII. Inmunoensayos ELISA Y EMIT ^{35, 40}

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Se detecta sencillamente el cambio de color. No se requieren materiales radiactivos. Es rápido el análisis. Es fácil de realizar. Dócil a la automatización. Disponible comercialmente	Normalmente específico a una sola droga. Los reactivos se han incorporado en tiras de papel. Los reactivos son caros. Es menos sensible que el RIA. Cada grupo de droga se analiza separadamente.

Cuadro IX. Inmunoensayo FPIA ^{35, 40}

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Es semicuantitativo. Es fácil de realizar. Los límites de corte son bajos. Tienen buena especificidad. Los reactivos duran mucho tiempo. Disponible comercialmente	El procedimiento es lento. Los reactivos son caros. El número de vendedores de reactivos es limitado.

Cuadro X. Comparación entre los inmunoensayos. ^{35, 40}

	EIA	FPIA	RIA
Instrumentación	SI	SI	SI
Estabilidad de los reactivos	MESES	MESES	3-4 SEMANAS
Costo de los reactivos	++	++	+
Automatización	SI	SI	SI
Pruebas/8 horas	100-400	250-300	200-400

Las técnicas de Inmunoensayo son un método conveniente para la detección de drogas o sustancias ilegales como ya se mencionó antes estas técnicas utilizan enzimas, radioisótopos o compuestos fluorescentes para detectar estas drogas, ya que por su fácil accesibilidad, bajo costo son las más utilizadas para identificar cantidades muy pequeñas, este tipo de pruebas preliminares o de screening son específicas, sensibles y eficientes para detectar sustancias tóxicas en la orina, pero hay que recordar que aunque este tipo de técnicas son eficientes hay que realizar otras pruebas con otros métodos más sensibles y precisos como por ejemplo hay métodos que en combinación nos proveen de un resultado más confiable por ejemplo la CG/MS (cromatografía de gases-espectrometría de masas) este proceso tiene dos pasos, uno donde la CG (cromatografía de gases) separa la muestra, mientras la MS (espectrometría de masas) se encarga de proveer la información molecular del compuesto, otra técnica a la cual se recurre es el HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución) esta técnica de laboratorio también es utilizada como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos, también estas técnicas tienen ventajas y desventajas las cuales se describen en los cuadros (XI y XII). ³⁷

Cuadro XI. CROMATOGRFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG/MS) ³⁷

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Es muy sensible	El costo es mucho más elevado
Técnica cualitativa y cuantitativa	Requiere personal capacitado
Es rápida la técnica	El gas es caro
Es automatizado	El equipo es caro
Cuantificación precisa	

Cuadro XII. CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN ³⁷

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Es rápida , eficiente	El equipo es caro
La detección es muy selectiva para los analitos dirigidos	Requiere personal capacitado
Es automatizado	
Se puede acoplar a otros equipos	

No obstante, el costo del ensayo de confirmación por GC/MS es mucho más alto comparado con el de una prueba de selección por inmunoensayo.

4. Planteamiento del problema.

Ante el gran consumo de benzodiazepinas en todo el mundo se pretende documentar los fundamentos de los métodos analíticos más utilizados en el laboratorio químico para su identificación presuntiva así como confirmativa en muestras biológicas (orina), ya que estas drogas se ven involucradas en la comisión de varios tipos de delitos. Como ejemplo se ha documentado que se utilizan este tipo de drogas para facilitar el asalto sexual en centros nocturnos agregando estas drogas en las bebidas de los individuos que asisten a este tipo de lugares para despojarlos de sus pertenencias; otro problema importante es que también se ven involucrados en accidentes automovilísticos.

Estas drogas que ciertamente se utilizan para perpetrar varios delitos son drogas hipnótico-sedantes las cuales al ser ingeridas producen somnolencia, confusión mental, desorientación así como amnesia. Así mismo, en algunos casos, la combinación de estas drogas con el alcohol aumenta sus efectos pudiendo provocar la muerte.

Por estas razones el presente trabajo monográfico tiene como objetivo recopilar los fundamentos de las técnicas analíticas más utilizadas para la identificación de benzodiazepinas y describir las ventajas y desventajas entre las técnicas con base en accesibilidad, tiempo, costo, sensibilidad y eficacia para identificar benzodiazepinas en orina como evidencia en delitos, que permita a cualquier persona interesada en estudiar, de acuerdo a su conveniencia, la elección de técnicas presuntivas en la identificación de benzodiazepinas en orina.

5. Objetivos.

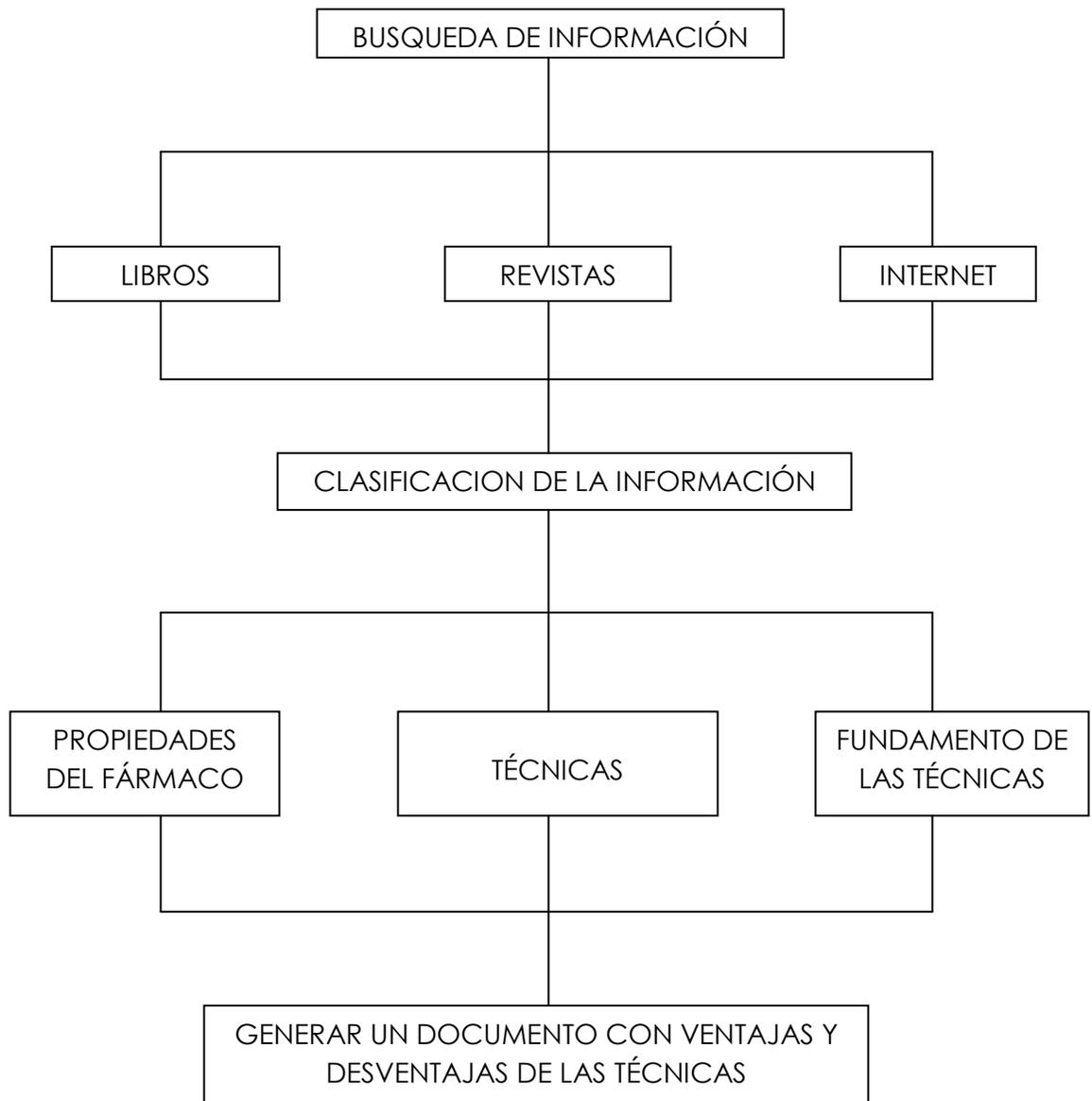
General:

- » Describir los fundamentos de las técnicas presuntivas y confirmativas que se utilizan para la detección de benzodiazepinas en muestras de orina, así como sus ventajas y desventajas que presentan entre si.

Específicos:

- » Describir los fundamentos de las técnicas comúnmente utilizadas para la identificación de benzodiazepinas.
- » Describir ventajas y desventajas de técnicas presuntivas y definitivas con respecto a costo, tiempo, eficacia, especificidad y sensibilidad.
- » Establecer la importancia de estudiar a las benzodiazepinas en muestras de orina.

6. Diseño metodológico.



7. Resultados.

Ya se menciona que la identificación de las benzodiazepinas así como de sus metabolitos, es en orina ya que, después de ser ingeridas éstas son excretadas, este fluido biológico es el preferido y más accesible para su análisis, los inmunoensayos o pruebas de screening son métodos eficaces, sensibles y no son tan costosos en comparación con técnicas cromatográficas como el HPLC y CG/MS que son más costosas, con respecto a las técnicas colorimétricas y a la cromatografía en capa fina los inmunoensayos son más sensibles y eficientes ya que la mayoría se realizan con equipos automatizados, mientras que las dos técnicas anteriores se realizan de manera manual además de que proveen un resultado cualitativo.

En los siguientes cuadros se muestra una comparación general de las técnicas que se analizaron.

7.1 Comparación de la técnica colorimétrica, cromatografía en capa fina e inmunoensayo.

TÉCNICA COLORIMÉTRICA ¹⁰	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA ⁷	TÉCNICA INMUNOLÓGICA ^{35, 40}
Determina solo un fármaco	Determina varios fármacos	Determina varios fármacos
Inespecífica	Específica	Específica
Resultado positivo o negativo	Resultado positivo o negativo	Resultado positivo o negativo
Cualitativa	Cualitativa	Cualitativa
No es costosa	No es costosa	No es costosa
Manual	Manual	Automatizada

7.2 Comparación general de las técnicas inmunoquímicas y cromatográficas.

TÉCNICAS INMUNOENSAYO ^{35, 40}	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ³⁷
Son técnicas sensibles	Son técnicas sensibles
No es tan costosa	Es costosa
Estas técnicas no requieren personal capacitado	Estas técnicas requieren personal capacitado
No cuantifican la cantidad de droga ilícita	Cuantifican la cantidad de droga ilícita
El proceso puede o no ser automatizado	Proceso automatizado

Estas benzodiazepinas como por ejemplo: Clordiazepóxido, diazepam, flunitrazepam, flurazepam, nitrazepam y temazepam tienen ciertas características físicas y químicas que hacen posible su identificación por medio de diferentes técnicas, en la siguiente tabla se mencionan las técnicas así como algunas de las características de las benzodiazepinas.

7.3 Características generales y técnicas de identificación de las benzodiazepinas.

CARACTERÍSTICAS	TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN	
	CLORDIAZEPÓXIDO	
	✓ Cromatografía ³⁷	
	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Alta sensibilidad	Técnica muy costosa
	Identificación de mezcla de drogas	Requiere personal capacitado
	Técnica automatizada	El equipo es caro
Polvo blanco cristalino Soluble en agua Punto de fusión: 212-218°	✓ Screening inmunoensayo ^{35, 40}	
	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Técnica sensible	Técnica cualitativa
	No requiere personal capacitado	Puede o no ser automatizada
	Costo accesible	
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Infrarrojo ✓ Absorción ultravioleta ✓ Extracción 	

CARACTERÍSTICAS	TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN	
	DIACEPAM	
Polvo blanco cristalino Soluble en cloroformo Punto de fusión:131-134°	✓ Cromatografía ³⁷	
	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Técnica rápida	El gas es muy caro
	Cuantifica la cantidad de droga	Requiere personal capacitado
	Alta sensibilidad	Técnica muy costosa
	✓ Screening inmunoensayo ^{35, 40}	
	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Disponible comercialmente	Algunos reactivos son caros
	Técnica específica	Técnica cualitativa
	Técnica fácil de realizar	
	✓ Infrarrojo ✓ Absorción ultravioleta	

CARACTERÍSTICAS	TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN	
	FLUNITRACEPAM	
Agujas amarillas pálidas Soluble en agua Punto de fusión:166-167°	✓ Cromatografía ³⁷	
	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Alta sensibilidad	Técnica muy costosa
	Técnica automatizada	El gas es caro
	Identificación de mezcla de drogas	Requiere personal capacitado.
	✓ Screening inmunoensayo ^{35, 40}	
	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Tienen buena especificidad	Algunos reactivos son caros
	Durabilidad de los reactivos	Específica a una sola droga
		✓ Infrarrojo ✓ Absorción ultravioleta

CARACTERÍSTICAS	TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN	
	FLURACEPAM	
Barras blancas Soluble en éter Punto de fusión:77-82°	✓ Cromatografía ³⁷	
	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Técnica selectiva	El equipo es caro
	Técnica rápida	El gas es caro
	Se puede acoplar a otros equipos	
	✓ Screening inmunoensayo ^{35, 40}	
	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Técnica barata	Reactivos caros
	Técnica sensible	Técnica cualitativa
	Técnica fácil de realizar	Puede o no ser automatizada
✓ Infrarrojo		
✓ Absorción ultravioleta		

CARACTERÍSTICAS	TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN	
	NITRACEPAM	
Polvo amarillo cristalino Soluble en etanol y cloroformo Punto de fusión:224-226°	✓ Cromatografía ³⁷	
	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Técnica muy sensible	Requiere personal capacitado
	Se puede acoplar	Técnica muy costosa
	Técnica rápida	
	✓ Screening inmunoensayo ^{35, 40}	
	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Técnica sensible	Específica a una sola droga
	Técnica específica	No cuantifican la cantidad de droga
	Costo accesible	Técnica cualitativa
✓ Infrarrojo		
✓ Absorción ultravioleta		
✓ Extracción		

CARACTERÍSTICAS	TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN	
	TEMACEPAM	
	✓ Cromatografía ³⁷	
	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Alta sensibilidad	Técnica muy costosa
	Técnica automatizada	El gas es caro
	Identificación de mezcla de drogas	Requiere personal capacitado.
	✓ Screening inmunoensayo ^{35, 40}	
	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Técnica sensible	Técnica cualitativa
	Costo accesible	Reactivos caros
	No requiere personal capacitado	Puede o no ser automatizada
	✓ Infrarrojo	
	✓ Absorción ultravioleta	

8. Discusión de resultados.

El análisis de la orina para la detección de abuso de drogas implica a menudo una selección inicial a través de una prueba preliminar o de screening, existen diferentes técnicas que se pueden utilizar por ejemplo las técnicas colorimétricas son sencillas, baratas que no requieren de un personal especializado para realizarla, aunque su mayor desventaja es que no se pueden determinar varios fármacos mientras que la cromatografía en capa fina es una técnica que también es sencilla, barata y específica, estas dos técnicas se realizan de manera manual proveen un resultado cualitativo de la muestra, mientras que los inmunoensayos presentan otras ventajas como realizar de forma automatizada la prueba en menor tiempo.

Las técnicas inmunoensayo (pruebas preliminares) son técnicas específicas a una droga, sensibles, rápidas de realizar y no son tan costosas todas estas ventajas hacen posible que muchos laboratorios toxicológicos recurran a ellas como análisis presuntivo, para finalmente confirmar y cuantificar la cantidad de droga con un método más sofisticado como la cromatografía, las técnicas más utilizadas son la CG-MS o HPLC las cuales son eficientes, rápidas, sensibles para la identificación de la droga realizando su cuantificación, quizás las diferencias entre estos dos tipos de técnicas es que los inmunoensayos son más baratos pero no pueden cuantificar la droga mientras que la CG-MS o HPLC son más específicas y sensibles pero el inconveniente es que este tipo de técnicas son mucho más caras a diferencia de los inmunoensayos que son más accesibles, claro que hay que recordar que estas técnicas de inmunoensayo son eficientes pero siempre hay que confirmar el resultado con la CG/MS o HPLC para obtener un resultado más preciso y confiable para la identificación de las benzodiazepinas.

Existen gran cantidad de benzodiazepinas como el clodiazepóxido, diazepam, flunitrazepam, etc, todas estas drogas pueden ser identificadas por diferentes técnicas ya se describieron los inmunoensayos y la cromatografía, así como las ventajas y desventajas de cada técnica, pero existen otras técnicas como el infrarrojo, absorción ultravioleta y extracción las cuales no se incluyen en este trabajo de investigación.

9. Conclusiones.

Se logró recabar la información necesaria así como documentar desde el punto de vista químico-legal los fundamentos de las técnicas presuntivas y confirmativas que se utilizan en el laboratorio toxicológico para la identificación y cuantificación de benzodiazepinas en muestras de orina.

Se describieron varios aspectos importantes sobre las benzodiazepinas para finalmente generar un cuadro comparativo de las ventajas y desventajas que presentan cada una de las técnicas.

Concluyendo que las técnicas de inmunoensayo en efecto son más sensibles, eficaces, accesibles y menos costosas en comparación a las técnicas cromatográficas como el HPLC que a su vez es más barato que la CG/MS.

Sin olvidar que las tanto las técnicas presuntivas como las confirmativas son complementarias para realizar un análisis toxicológico.

10. Propuesta.

- Se propone que podría hacerse un estudio sobre las técnicas de inmunoensayos comerciales ya que estos son adquiridos por algunos laboratorios y posiblemente estén interesados en obtener información acerca de los productos que adquieren. En cuanto a que marca quizás es más sensible, rápida, eficaz así como menos costosa para implementarla en el laboratorio de toxicología, ya que en esta tesina sólo se abarca información general de los fundamentos de las técnicas de inmunoensayo y no de los kits de marcas registradas.

11. Lista de referencias.

1. Lore A. La violencia impune: una mirada sobre la violencia sexual contra la mujer. 2ª ed. México D.F.: Fondo cultural Albergues de México, 1999.
2. Gutiérrez AD. y Castillo PI. (2008). Consumo de drogas en pacientes de primer ingreso a tratamiento en Centros de Integración Juvenil, Enero-Junio 2007. [En línea]. México: Centros de Integración Juvenil, Dirección de Investigación y Enseñanza, 2008 <<http://www.cij.gob.mx/Paginas/MenuIzquierdo/InformacionPara/Especialistas/Investigacion/detalle.asp?offset=20&id=57>> [consulta: 12 Sep. 2008].
3. Ley General de la Salud. México, DF: Sista; 2004.
4. Vargas AE. Medicina legal. México D.F: Trillas, 1996.
5. Ruiz LB. Qué son, de donde provienen, como alteran la percepción y el comportamiento y cuales son los riesgos de consumir estas sustancias. México D.F.: Divulgación de la ciencia UNAM, 2002.
6. Contreras F. Determinación de psicofármacos en orina. [artículo en línea]. Retel revista de toxicología en línea, 2004 <<http://www.sertox.com.ar/retel/n04/004.pdf>> [consulta: 25 Oct. 2008].
7. Bonet RC. Toxicología de los Psicofármacos. España: Mosby, 1993.
8. Cohen Y, Pradeau D. Análisis químicos farmacéuticos de medicamentos. México: UTEHA Noriega editores, 1998.
9. Gisbert C. Medicina Legal y Toxicológica. 6ª ed. Barcelona: Editorial Masson, 2004.
10. Clarke EGC. Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. Vol. 2., The pharmaceutical press, 1975.
11. Katzung BG. Farmacología básica y clínica. 6ª ed. México D.F: Manual moderno, 1996.

12. Velasco MA. Farmacología fundamental. México: Mc Graw Hill, 2003.
13. Steven Bk. Drug abuse Handbook. London: crc press, 1997.
14. The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological/Susan Bubavari ed. Radway, New Jersey: Merck, 1996.
15. Clark W. Farmacología clínica. 12ª edición. México: Medica Panamericana, 1989.
16. Fenton J. Toxicology a case-oriented approach. London: crc press, 2002.
17. Velázquez B. Farmacología y su proyección a la clínica. 15ª ed. España: Oteo, 1987.
18. Parslow TG, Stites DP, Terr AI. 10ª ed. Inmunología básica y clínica. México DF: manual moderno, 2002.
19. Mycek M. Farmacología. 2ª ed. México: Mc Graw Hill, 2004.
20. Goth A. Farmacología medica principios y conceptos. 11ª ed. Barcelona: Doyma, 1984.
21. Ashton DM ed. Las benzodiazepinas: como actúan en l organismo. En: Las benzodiazepinas: cual es su mecanismo de acción y como suspender la ingestión [en línea]. Inglaterra: Ray Nimmo, 2002 <<http://www.benzo.org.uk/espamn/bzcha01.htm>> [consulta: 2 Nov. 2008].
22. K.Wolff, M.Farrell, J. Marsden, M. G. Monteiro, R. Ali, S. Welch y J. Strang. Revision de los Indicadores Biológicos de uso ilegal de drogas, consideraciones prácticas y utilidad clínica. [artículo en línea]. RET, Revista de Toxicomanías, 2001; 28. <<http://www.cat.barcelona.com/ret/pdfred/RET28-1.pdf>> [consulta: 10 Nov. 2008]
23. Prys R. Farmacocinética de los Anestésicos. México D.F.: Manual Moderno, 1996.
24. Anderson SC, Cockayne S. *Química Clínica*. México, D.F.: McGraw-Hill, 1995.

25. Cabrera J, Cabrera R. Aspectos Tóxicos de las Benzodiazepinas y su Tratamiento. Phronesis Vol. 11 No. 3, 1990.
26. Connors KA. A textbook of pharmaceutical. New York: John Wiley & Sons, 1982.
27. Fifield FW, Kealey D. Principles and practice of analytical Chemistry. London: Blackie-academic & professional, 1990.
28. Colliso IB, Spiebler VR, Guluzian S, Sedgwick PR. Setting cutoff concentrations for immunoassay screening of postmortem blood: J Forensic Sci 1998;43(2).
29. Cooper G, Wilson L, Reid C, Baldwin D, Hand C, Spiebler V. Comparison of GC-MS and EIA results for the analysis of Methadone in oral Fluid: J Forensic Sci 2005; 50(4).
30. Elsohly MA, Gul W, Murphy TP, Avula B, Khan IA. LC-(TOF) MS analysis of benzodiazepines in urine from alleged victims of drug-facilitated sexual assault: J Anal Toxicol 2007; 31(8).
31. Simon W. Drugs of abuse. 2a Edition. London: Pharmaceuticals Press, 2005.
32. Goldsby RA. Inmunología. 5ª Edición. México D.F.:Mc Graw Hill, 2003
33. Margni RA. Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos. 4ª Edición. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1990.
34. González JM. Tecnicas y métodos de Laboratorio Clínico. 2ª Edición. Barcelona. Editorial Masson. 2004.
35. Flanagan RJ. Fundamentals of analytical toxicology. Gran Bretaña: Editorial Willey, 2007.
36. Robert L. Fitzgerald, Douglas A. Regin, and David A. Herold. Detecting benzodiazepines: immunoassays compared with negative chemical ionization Gas Chromatography/Mass Spectrometry: Clin Chem 1994; 40 (3).
37. Augsburger M, Rivier L, Mangin P. Comparison of different immunoassays and GC-MS screening of benzodiazepines in urine: J Pharm Biomed Anal. 1998; 18 (4-5).

38. Drugs of abuse testing in urine: statistical approach and experimental comparison of immunochemical and chromatographic techniques: J of Analytical Toxicology 1994; 18
39. Comparison of common immunoassay kits for effective application in Workplace drug urianalysis: Forensic Science Riview 1994; 6 (19)
40. Adam Negrusz, Ph.D; Christine M. Moore, Ph.D; Teri L. Stockham, Ph.D; Kristine R. Poiser, B.A.; Jennifer L. Kern. B.S. Rameshrajaa Palaparthi, B. Pharm.; Ngoc Lan T. Le, B.S.; Philip G. Janicak, M.D. ; and Naomi A. Levy, M.D. Elimination of 7-aminoflunitrazepam and flunitrazepam in urine after a single dose of Rohypnol: J Forensic Sci 2000; 45 (5).
41. Weidong He, Ph.D.; Nicholas Parissis, Ph.D.; and Trifon Kiratzidis, M.D. Determination of benzodiazepines in forensic samples by HPLC with photo-diode array detection: J Forensic Sci 1998; 43 (5).