



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”**

**INVESTIGACIÓN TOXICOLÓGICA DE
BENZODIAZEPINAS EN ORINA Y SANGRE**

TESINA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
MARICELA NÁPOLES PEREDO

ASESOR: M. en C. F. OSCAR GUADARRAMA MORALES

MÉXICO D. F., OCTUBRE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

	Págs.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LAS BENZODIAZEPINAS	3
1.1 Características Químicas	3
1.2 Características Farmacológicas	5
1.2.1 Acciones Farmacológicas	5
1.2.2 Farmacocinética	6
1.2.3 Farmacodinamia	8
1.2.4 Efectos Secundarios	10
1.2.5 Interacciones Medicamentosas	12
1.2.6 Toxicidad	12
1.2.7 Tratamiento	13
CAPÍTULO 2 INVESTIGACIÓN TOXICOLÓGICA	14
2.1 Muestras Biológicas para Análisis Toxicológico	14
2.2 Muestras Biológicas Provenientes de Sujeto Vivo	14
2.3 Envasado y Conservación de las Muestras	16
2.4 Análisis Químico Toxicológico	16

CAPITULO 3 DETERMINACIÓN DE BENZODIAZEPINAS EN MUESTRAS DE ORINA Y SANGRE	17
3.1 Preparación de la Muestra	17
3.1.1 Hidrólisis previa a la Extracción	18
3.2 Extracción de Benzodiazepinas	19
3.3 Pruebas Presuntivas para la Detección de Benzodiazepinas	21
3.3.1 Prueba Bratton Marshall	22
3.3.2 Cromatografía en Capa Fina (CCF)	23
3.3.3 Ensayos Inmunológicos	24
3.4 Pruebas Confirmativas por Excelencia	28
3.4.1 Propuesta 1. Determinación de Benzodiazepinas por CG-MS	28
3.4.2 Propuesta 2. Determinación de Benzodiazepinas por LC-MS/MS	30
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
4. OBJETIVOS	33
5. DISEÑO METODOLÓGICO	34
6. RESULTADOS	35
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
8. CONCLUSIÓN	43
9. PROPUESTA	44
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
GLOSARIO	48

RESUMEN

Las benzodiazepinas constituyen un numeroso grupo de psicofármacos, ampliamente utilizados por sus aplicaciones clínicas y por su amplio margen de seguridad, la importancia toxicológica de las benzodiazepinas deriva de que son fármacos comúnmente implicados en intoxicaciones, afectan a ciertas habilidades motoras que dan origen a accidentes y con el tiempo han sido partícipes en fines criminales, en el sentido de que la amnesia que causan es aprovechada para cometer agresiones sexuales. Debido, a la evidente importancia toxicológica de las benzodiazepinas se pretende realizar una investigación documental de los fundamentos y técnicas para la identificación de benzodiazepinas en orina y sangre. Para la elaboración de éste trabajo se realizo una revisión bibliográfica exhaustiva recopilando información relacionada a propiedades químicas, farmacológicas, farmacocinéticas y fundamento de técnicas, posteriormente la información se selecciono, depuro y sintetizo para generar ventajas y desventajas de las técnicas utilizadas así como los pasos críticos en las fases para la identificación y cuantificación de benzodiazepinas e implicaciones.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia es evidente que las drogas han tenido gran impacto a nivel mundial debido al incremento en el consumo de ellas que conllevan al desarrollo de abuso y adicción; en la década de los años cincuentas se produce un auge de la industria farmacéutica, la cual lanza al mercado psicofármacos tales como los barbitúricos que actualmente su uso está siendo sustituido por las benzodiazepinas por su amplio margen de seguridad que con el tiempo desde el punto de vista toxicológico está tomando nuevas dimensiones con la aplicación de las mismas puesto que no solo están implicadas en el área de la salud sino también en la legal, ya que se han visto involucradas en casos de intoxicaciones tanto voluntarias como accidentales e incluso utilizadas con fines homicidas así como medio para cometer delitos, previa administración a incautas víctimas, por su importancia toxicológica que tienen no solo las benzodiazepinas sino drogas en general ha habido la necesidad de efectuar determinaciones de las mismas en muestras biológicas en los laboratorios forenses en las que pueden darse dos situaciones: que se conozca la naturaleza del tóxico implicado y que el tóxico sea desconocido, e incluso como ocurre con frecuencia, que no se sepa si existe o no alguno en una muestra determinada; en el primer caso se pueden utilizar directamente métodos específicos para la identificación y cuantificación sin embargo es mucho más frecuente encontrarse frente a una muestra en la que no se conoce si se contiene alguna sustancia. Lo cual exige seguir una metodología compleja y mucho más compleja. Por esta razón se ha generado la necesidad de efectuar una investigación a fondo de los fundamentos y técnicas para la identificación y cuantificación de benzodiazepinas en muestras de orina y sangre; para la elaboración de éste trabajo se realizó una revisión bibliográfica recopilando la información referente a propiedades químicas, farmacológicas, farmacocinéticas y fundamentos de técnicas del cual se selecciono, depuro y sintetizo; de esta manera se obtuvieron puntos críticos y consideraciones en las técnicas analíticas para que en algún momento la persona que este interesada en realizarlas dentro de un laboratorio pueda realizarlas con menos dificultad ahorrándose un poco más de tiempo, esfuerzo y dinero.

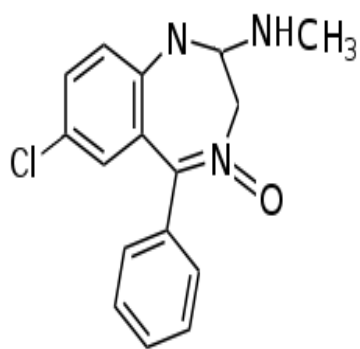
CAPÍTULO 1

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LAS BENZODIAZEPINAS

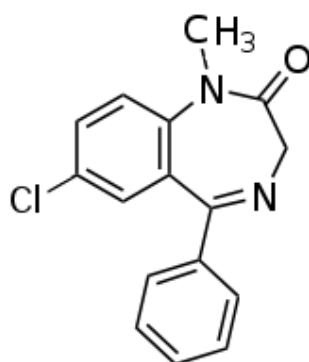
Desde la antigüedad se han utilizado diferentes productos para la sedación, el primer compuesto químico para este fin el bromuro (1853), pero con el tiempo fue desplazado por los barbitúricos hasta que en el año de 1957 cuando se encontró de manera fortuita un compuesto con propiedades no sólo con acción sedante sino también miorrelajante, el Clordiazepoxido, el cual se comercializo en 1960 con el nombre de Librium y tres años más tarde el diacepam con el nombre de Valium la cifra de compuestos benzodiazepinicos sintetizados ha ido en aumento, entre estos esta el flunitrazepam que en el mercado se conoce como Rehypnol por lo que de forma paulatina y por su mayor seguridad en el uso ha ido desplazando a los barbitúricos.

1.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

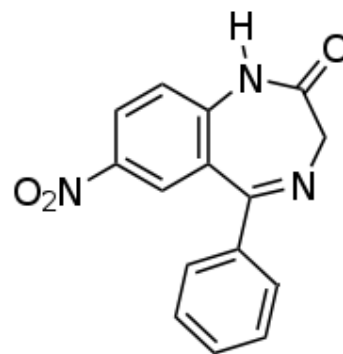
Estructuralmente las benzodiazepinas se encuentran formadas por una estructura común para todas ellas a las que se agregan diferentes radicales; esa estructura común se halla compuesta por un anillo de benceno, fusionado a otro de diazepina (heterociclo de siete miembros con dos heteroátomos) (1,2). Así los grupos aceptores de electrones en posición dos aumentan la potencia, mientras que los sustituyentes en cualquier otro lugar disminuyen la actividad. Un grupo electronegativo en posición siete (grupo halógeno o grupo nitro), es importante para la actividad sedante-hipnótica (3,4).
Fig.1.



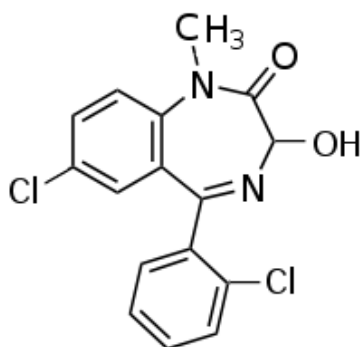
Clordiazepóxido



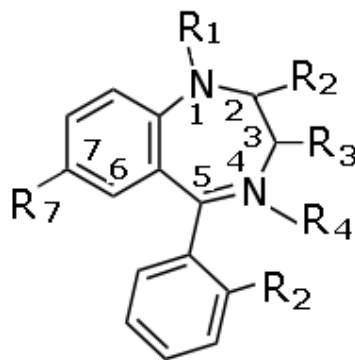
Diazepam



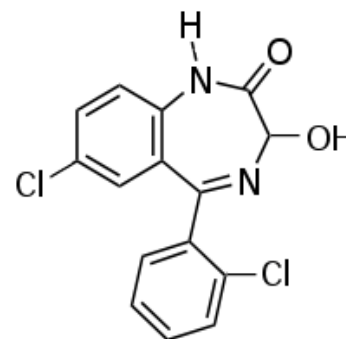
Nitrazepam



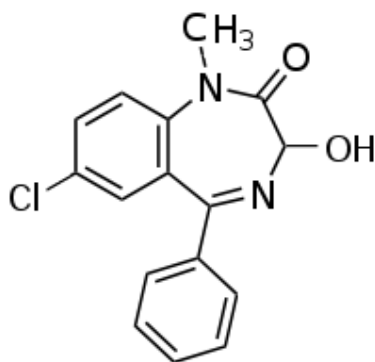
Lormerazepam



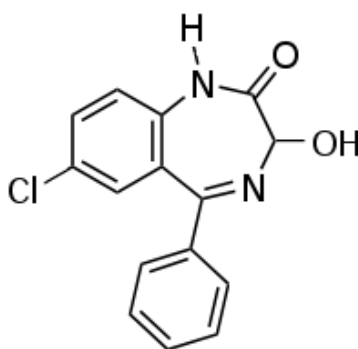
Estructura General



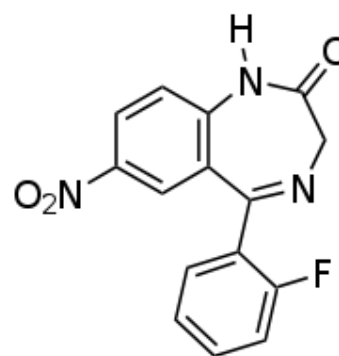
Lorazepam



Temazepam



Oxazepam



Flunitrazepam

Fig. 1 Estructura química de algunas benzodiazepinas

1.2 CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS

1.2.1 ACCIONES FARMACOLÓGICAS

Las benzodiazepinas son un grupo de fármacos que poseen varias acciones farmacológicas que amplían el campo de sus posibilidades terapéuticas. De este modo, aunque comenzaron siendo principalmente sedantes y ansiolíticos menores, en la actualidad algunos fármacos del grupo son hipnóticos (a dosis elevadas deprimen el Sistema Nervioso Central en un estado que semeja al sueño) de elevada eficacia, anticonvulsivantes y miorelajantes (5,6).

Acción ansiolítica. En personas sanas y a dosis terapéuticas, no altera la realización de ejercicios físicos ni mentales, pero a dosis mayores producen sopor, letargia, sueño, ataxia y debilidad muscular. En los pacientes con ansiedad, las benzodiazepinas alivian tanto la tensión subjetiva como los síntomas objetivos de temblor, taquicardia, sudor, molestias digestivas, etc. La respuesta de las benzodiazepinas es muy rápida a diferencia de otros ansiolíticos como los antidepressivos. Se recomienda tratamientos cortos y no superar las cuatro semanas o, en su caso, usar pautas intermitentes con semanas de descanso (7).

Acción hipnótica. Producen una disminución de la latencia para el comienzo del sueño en nivel donde intervienen movimientos oculares rápidos (MOR), del tipo de vigilia y del número de despertares. Existe un aumento en el tiempo total de sueño y de la eficiencia del sueño. La fase MOR no se ve alterada. En función del tipo de insomnio, se recomienda uno de acción rápida combinado con otro de acción media. Los de acción rápida pueden producir alteraciones de la memoria, ansiedad y al día siguiente mayor riesgo de dependencia (7).

Acción anticonvulsivante. Ejercen una acción anticonvulsivante efectiva para convulsiones secundarias a tóxicos, como en convulsiones febriles, el síndrome de abstinencia a alcohol o barbitúricos, y para algunos tipos de epilepsia (pequeño mal y *status epilepticus*).

Acción miorrelajante. Las benzodiazepinas producen relajación de la musculatura esquelética en estados distónicos, discinéticos, hipertónicos y espásticos; su acción es central y no sobre la placa muscular, pero en cuanto a las dosis requeridas para producir miorrelajación están muy próximas a las de sedación se ha limitado su uso (8).

1.2.2 FARMACOCINÉTICA

Las benzodiazepinas son fármacos con una elevada liposolubilidad, lo que facilita una gran distribución por todo el organismo. Se absorben de forma casi completa cuando se administran por vía oral y alcanzan su concentración máxima en sangre (T_{max}) en aproximadamente una hora, aunque varía dependiendo de la benzodiazepina, de la forma farmacéutica y de características individuales. Por vía intramuscular, la mayoría de las benzodiazepinas, y en particular clordiazepóxido y diazepam, presentan una absorción errática y lenta por acumularse en tejido adiposo; las que mejor se absorben son el lorazepam y el midazolam.

Una vez en sangre, se unen en gran proporción a proteínas plasmáticas de forma variable en un 70 a 99%, siendo la forma libre la que atraviesa el sistema nervioso central y la que es farmacológicamente activa. Todas las benzodiazepinas se distribuyen ampliamente por todos los tejidos cruzando la barrera hemato-encefálica y placentaria.

La duración del efecto tras la administración de una dosis viene determinada por su distribución más que por su eliminación; una excepción la constituyen las benzodiazepinas de eliminación rápida. Aquellas benzodiazepinas con elevada liposolubilidad, presentan una fase inicial de distribución muy rápida y tras una dosis única intravenosa, las concentraciones plasmáticas pueden caer hasta 10 veces durante los primeros 30 minutos (9,10). En administraciones continuas, sin embargo, la eliminación condiciona de manera importante la duración del efecto. (Cuadro 1)

Cuadro 1. Características farmacocinéticas de las benzodiazepinas (2,9).

Benzodiazepinas	Acción	Vida media $T_{1/2}$ (hs)	Volumen de distribución V_d (L/Kg)	Unión proteínas (%)
Brotizolam	Corta	5	0,66	85-95
Midazolam	Corta	1,3-3,1	0,5-1,7	96
Triazolam	Corta	2,2	0,7-1,5	77
Alprazolam	Intermedia	6-20	0,6-0,8	70
Flunitrazepam	Intermedia	15-30	2,7-3,9	78
Lorazepam	Intermedia	9-22	0,7-1,0	85
Nitrazepam	Intermedia	18-31	1,5-2,7	86
Oxazepam	Intermedia	4-13	0,4-0,8	90
Temazepam	Intermedia	8-12	0,7-1,3	97
Clobazam	Prolongada	9-30	0,8-1,8	87-90
Clorazepato	Prolongada	24-60	0,9-1,3	82
Clordiazepóxido	Prolongada	6-28	0,2-0,6	94-97
Diazepam	Prolongada	20-100	0,9-2,0	96-98
Flurazepam	Prolongada	40-100	3,0-4,0	96
Nordiazepam	Prolongada	40-100	0,9-1,2	98

La vida media de eliminación de las benzodiazepinas es muy variable dependiendo de cada fármaco y de la existencia o no de metabolitos activos. Así por ejemplo el halazepam tiene una vida media en sangre entre las dos y cuatro horas pero sus efectos son mucho más prolongados porque posee un metabolito activo; el nordiazepam cuya vida media es de unas 30 a 200 horas, a su vez este es metabolizado a otro metabolito activo; el oxazepam, que aun prolonga más los efectos del medicamento administrado.

Las benzodiazepinas se metabolizan principalmente por enzimas microsomales hepáticas. Hay benzodiazepinas que tienen una biotransformación rápida en intestino, antes de ser absorbidas. La ruta habitual del metabolismo suele conducir a compuestos N-Desalquilados (denominado Nor-), la mayor parte de los cuales son metabolitos activos como es el caso del Nordiazepam. La segunda etapa del metabolismo suele ser una hidroxilación en posición tres del anillo diazepínico, que también conduce a la aparición de metabolitos activos como el Oxazepam, obtenido por la hidroxilación del Nordiazepam. La tercera etapa viene representada por la conjugación de los compuestos hidroxilados, principalmente con Ácido Glucorónico (9,11). Fig. 2

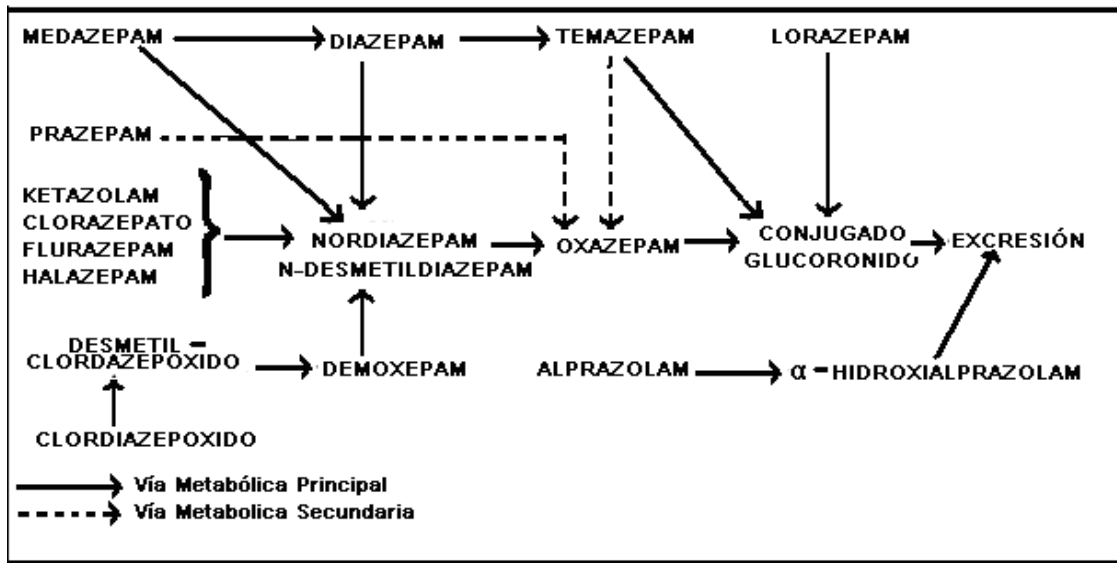


Fig. 2 Rutas metabólicas de algunas benzodiazepinas (9).

1.2.3 FARMACODINAMIA

Mecanismo de Acción

Las benzodiazepinas actúan aumentando la acción de una sustancia química natural del cerebro, el ácido gamma-aminobutírico (GABA) que es un neurotransmisor de bajo peso molecular incluido en la categoría de aminoácidos, que transmite mensajes desde una célula cerebral (neurona) hacia otra; el mensaje que el GABA transmite es un mensaje de inhibición causada por hiperpolarización de la membrana postsináptica; le comunica a las neuronas con las que se pone en contacto que disminuyan la velocidad o que dejen de transmitir impulsos; el 40% de las millones de neuronas del

cerebro responden al GABA lo que significa que el GABA tiene un efecto general tranquilizante natural con que cuenta el organismo. Las benzodiazepinas aumentan esta acción natural del GABA, ejerciendo de esta forma una acción adicional de inhibición neuronal. (12)

La forma en que el GABA transmite su mensaje inhibitor es a través de lo que podríamos llamar un inteligente dispositivo electrónico. Las moléculas del GABA del interior de las vesículas sinápticas de la neurona son liberadas en la hendidura sináptica que al difundirse en ella se unen a los receptores GABA en la membrana de la neurona postsináptica. La unión del GABA con su receptor permite la apertura de canales de Cl^- y por lo tanto el flujo de iones cloruro a través de estos canales, difundándose rápidamente a través de la membrana generando de esta manera que el interior se vuelva más negativo causando hiperpolarización, como resultado la no generación del impulso nervioso. Fig. 3

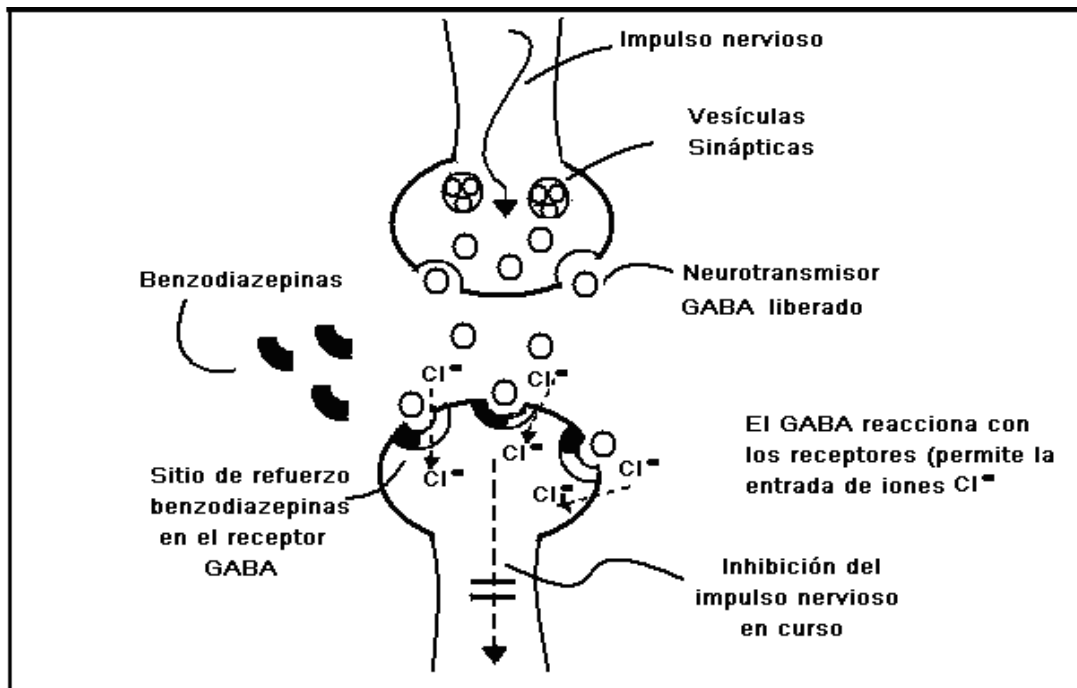


Fig. 3. Diagrama de mecanismo de acción del neurotransmisor natural GABA y de las benzodiazepinas en las células del sistema nervioso (neuronas) (12).

Las benzodiazepinas al actuar como agonistas del GABA también reaccionan en sus propios sitios. Las benzodiazepinas al unirse con su receptor, potencian la acción del GABA, lo cual permite que entre en las neuronas una mayor cantidad de iones de cloruro aumentando así la resistencia de la neurona a la excitación (10,41).

1.2.4 EFECTOS SECUNDARIOS

Por lo general, al menos en las manifestaciones que pueden presentarse sobre el SNC, los efectos secundarios no son sino una simple prolongación de los efectos farmacológicos normales. Sin embargo, son relativamente dosis independiente es decir la dosis puede ser la indicada o en menor dosis y aún así pueden presentarse los efectos secundarios, siendo más frecuentes cuando se administran dosis muy elevadas.

Efectos sobre el SNC. Son los efectos secundarios que más frecuentemente aparecen con la administración de benzodiazepinas, destacando entre ellos la somnolencia. Puede manifestarse además ataxia, obnubilación, hipotonía muscular o cierta incoordinación motora. Se han citado multitud de efectos neurológicos o psiquiátricos, entre los que destacan depresión, fatiga, astenia, apatía, disminución de la actividad intelectual, desorientación temporo-espacial, confusión, cefalea, crisis de llanto, delirio, disartria, estupor, tremor, rigidez, distonía, vértigos, discinesia bucal, euforia, nerviosismo e irritabilidad, dificultad para la concentración, síndrome extrapiramidal, nistagmus, tiempo de reacción alargado, pesadillas, aumento del apetito y encefalopatía en pacientes con insuficiencia renal.

Los efectos secundarios suelen aparecer durante los primeros días de tratamiento y disminuyen con la continuación del tratamiento en algunas ocasiones, o tras una disminución de la dosis administrada. Hay cierta predisposición a la aparición de efectos secundarios en niños, ancianos, pacientes con hepatopatías o con disminución de la albúmina sérica.

Reacciones Paradójicas. Suelen presentarse en pacientes con enfermedades psiquiátricas. Tales reacciones incluyen un aumento de la hostilidad y de la irritabilidad, sueños vividos, inquietantes o pesadillas (frecuentemente en tratamientos con nitrazepam y flurazepam durante la primera semana de tratamiento). Del mismo modo se ha señalado la aparición de cuadros psicóticos e impulsos suicidas (8).

En ocasiones se ha alegado el consumo de fármacos de este grupo para la comisión de delitos o de actos violentos. Incluso se ha llegado a excusar la comisión de homicidios por el consumo de benzodiazepinas, achacando el acto violento a la aparición de un efecto paradójico. En tales casos hay que obrar con cautela, e intentar demostrar, cuando menos, que se ha producido dicho consumo si la ingesta es reciente, por los métodos analíticos más sensibles (8).

El cuadro típico de estas reacciones se caracteriza por la locuacidad, inquietud, ansiedad, euforia, trastornos del sueño, excitación, hiperactividad, aumento de la espasticidad muscular e hiperreflexia.

Efectos sobre el Aparato Digestivo. La sintomatología digestiva es menos frecuente que la que afecta al SNC y suele aparecer en menos de 1% de los pacientes bajo este tratamiento. Dentro de las manifestaciones más frecuentes cabe destacar la constipación digestiva, sequedad de boca, sialorrea, náuseas, sabor amargo o metálico, trastornos del apetito, vómitos. Algunos fármacos del grupo, como el diazepam, flurazepam o clordiazepóxido han causado colestasis intrahepáticas (8).

Efectos sobre el Aparato Genitourinario. Se han comprobado una disminución de la libido e irregularidades menstruales, retención urinaria, dificultad miccional o incontinencia urinaria. En ocasiones se ha visto hipotonía vesical en tratamientos con diazepam y clordiazepóxido.

Efectos Cardiovasculares. La administración de diazepam y clordiazepóxido ha causado, en un porcentaje inferior al 1%, hipotensión arterial. También puede presentarse en ocasiones taquicardia y disminución del gasto cardiaco. Se han señalado casos de bradicardia, palpitaciones, flebitis, trombosis venosa y edema. La inyección endovenosa rápida de benzodiazepinas puede causar paro cardiorrespiratorio, depresión respiratoria o síntomas de colapso cardiovascular (8).

Efectos sobre Piel. Las manifestaciones cutáneas se presentan en raras ocasiones. Cuando aparecen suelen presentarse en forma de rash cutáneo, con características eritemato-maculares; reacciones urticariformes; prurito; fotosensibilidad y con menor frecuencia la aparición de lesiones bullosas y ampollosas con necrosis de las glándulas sudoríparas (8).

Efectos Hematológicos. Se destacan las reacciones de leucopenia (neutropenia y granulocitopenia), anemia, anemia hemolítica, descenso de hematocrito, púrpura trombocitopénica y eosinofilia.

Entre las enzimas séricas se han constatado un aumento de las transaminasas y bilirrubina, LDH (deshidrogenasa lactica) y fosfatasa alcalina. Tras la administración intramuscular de diazepam o clordiazepóxido se ha visto un aumento de los niveles de CPK (creatinina fosfoquinasa) (4,8).

1.2.5 INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS.

Las interacciones medicamentosas no suelen ser frecuentes con las benzodiazepinas, excepto si se asocian a otros depresores del SNC, en cuyos casos suelen producir efectos sumatorios que incrementan la depresión neurológica.

Los antiácidos suelen retardar la absorción de las benzodiazepinas por vía oral, aunque habitualmente no afectan a la biodisponibilidad del fármaco. Fármacos como isoniacida, cimetidina o fenitoína interfieren con el metabolismo hepático de las benzodiazepinas, inhibiendo su metabolismo (7).

1.2.6 TOXICIDAD

Las benzodiazepinas son fármacos con un amplio margen terapéutico, de modo que pueden administrarse aun a dosis altas con una relativa seguridad. De este modo es difícil alcanzar dosis tóxicas que supongan un gran peligro para la vida del intoxicado siempre y cuando la intoxicación se haya producido sólo por benzodiazepinas.

Las manifestaciones clínicas que se producen tras una sobredosis suelen seguir la misma dinámica que la de los efectos secundarios. Entre estas manifestaciones las más frecuentes son la somnolencia, obnubilación, seguidas de letargia y disminución de reflejos.

Habitualmente no se producen efectos cardiovasculares ni respiratorios graves a menos que se haya ingerido concomitantemente alcohol o fármacos depresores del SNC (antidepresivos, neurolépticos, barbitúricos, etc.). También es posible la aparición de estos efectos cuando se a utilizado la vía endovenosa, tras una sobre dosis accidental o intencionada (suicida). No obstante puede haber mínimos cambios en la

presión sanguínea, en la frecuencia cardíaca o respiratoria. Con frecuencia se producen ataxia, hipnosis, coma (sólo a dosis muy elevadas) y la muerte.

Las dosis tóxicas son muy variables para cada fármaco de este grupo. Se estima que el flurazepam causa una depresión neurológica mayor que otras benzodiazepinas. En general las dosis tóxicas son muy elevadas, de forma que por ejemplo, se pueden ingerir hasta 0.5 g de diazepam, ó 0.8 g de clordiazepóxido sin sintomatología de extrema gravedad (4). Se han establecido, una serie de niveles terapéuticos, tóxicos y fatales de benzodiazepinas en sangre. (Cuadro 2.)

Cuadro 2. Niveles sanguíneos de benzodiazepinas (expresado en µg/mL)

Fármaco	Nivel terapéutico	Nivel tóxico	Nivel fatal
Bromazepam	0.08 – 0.15	-----	-----
Clordiazepóxido	1 - 8	3 - 25	> 20
Clobazam	0.33	-----	-----
Clonazepam	0.011 – 0.084	0.1	-----
Diazepam	0.05 - 2	1.5 - 15	>5
Flunitrazepam	0.01	-----	-----
Flurazepam	0.0005 – 0.0028	>0.2	-----
Medazepam	0.01 – 0.16	-----	-----
Nitrazepam	0.026 – 0.066	0.2	-----
Oxazepam	0.05 – 2	>2	-----

1.2.7 TRATAMIENTO

El tratamiento específico de la intoxicación por benzodiazepinas es mediante la administración del antagonista flumazenil, mismo que revierte en pocos minutos la depresión causada por estos fármacos. El flumazenil es una imidazobenzodiazepina de síntesis de estructura similar a la del midazolam, que presenta una afinidad particular y específica por los receptores benzodiazepínicos. De este modo, al fijarse con mayor afinidad sobre el receptor de las benzodiazepinas, bloquea el mismo y las desplaza, así el flumazenil puede revertir los efectos, revirtiendo los síntomas neurológicos de la intoxicación, por ejemplo una dosis intravenosa de flumazenil de 0.25 a 0.5 mg (en adultos) es suficiente para antagonizar una fuerte dosis de benzodiazepina previamente administrada.

En el tratamiento del síndrome de abstinencia se requiere la reducción paulatina y progresiva de la administración de benzodiazepinas. Si los síntomas por la deprivación son severos, su corrección se consigue mediante la sustitución por un barbitúrico (13).

CAPÍTULO 2

INVESTIGACIÓN TOXICOLÓGICA

Definición

La Investigación Toxicológica es el conjunto de procesos analíticos que tienen por objeto el aislamiento, identificación y determinación cuantitativa de los tóxicos tanto en muestras biológicas provenientes de sujeto vivo como de cadáver, con el fin de permitir el diagnóstico de intoxicación y esclarecimiento de hechos tales como suicidio y agresión sexual (14,15).

2.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

Hay una gran cantidad de muestras biológicas en el campo de investigación para detectar la presencia de algún tóxico. Las principales muestras (fluidos biológicos) analizadas son: contenido gástrico, orina, sangre, hígado, bilis, cerebro y riñones. De esta manera la selección de la muestra más adecuada para el análisis y su correcta conservación y manejo son requisitos indispensables en la investigación toxicológica. Dichas muestras para el análisis toxicológico deben recogerse teniendo en cuenta las condiciones particulares de cada caso y las referentes a la distribución y metabolitos (16,17).

2.2 MUESTRAS BIOLÓGICAS PROVENIENTES DE SUJETO VIVO

En la práctica las muestras de sujeto vivo para la investigación se reducen a sangre y orina, que se remiten en cantidad suficientes para llevar a cabo los análisis pertinentes. A continuación se describen consideraciones que hay que tener en cuenta para cada una de ellas.

Orina. La orina representa una muestra idónea para realizar gran variedad de ensayos preliminares. Las mayores ventajas de esta muestra son que la concentración de un tóxico en este fluido puede llegar a ser 100 veces mayor que en la sangre, además de que la orina esta exenta de proteínas por lo que las interferencias son mínimas; puede obtenerse fácilmente y en cantidad suficiente, y generalmente contiene concentraciones detectables, incluso cuando se han administrado a dosis terapéuticas; es aconsejable no añadir conservadores que podrían interferir en el análisis posterior (18). Una desventaja de este fluido es la facilidad para ser diluida con agua así como ser adulterada con sustancias químicas (lejía, vinagre, jabón líquido etc.) para producir resultados negativos, con el fin de asegurar la autenticidad de la muestra se evaluará el aspecto de la muestra así como también la temperatura, el pH y densidad urinaria, que permiten detectar la adulteración de la muestra. Se recomienda efectuar una determinación de creatinina en orina (rango normal de 0,5 a 3 gramos/litro, los valores menores a 0,3 indican probable dilución).

Sangre. Es una de las muestras más útiles para la identificación de tóxicos y especialmente para el análisis cuantitativo. Una consideración digna de mención es la referente a la conveniencia de obtener muestras de sangre que fluya libremente sin necesidad de presionar ningún tejido para obtener muestra suficiente. En general no se recomienda el uso de sangre recogida en la autopsia de cavidades abiertas ya que, procede de varios tejidos, y por otro lado puede estar contaminada con otros fluidos que puedan tener un efecto de concentración o dilución. También debe de tenerse en cuenta el hecho de la distribución del tóxico en la sangre. Normalmente los tóxicos se distribuyen entre los eritrocitos y el plasma en proporción variable para cada sustancia. La mayor parte de los tóxicos orgánicos van disueltos en el plasma o unidos a proteínas, mientras que son pocos los que se transportan unidos a los hematíes; por ello la sangre total y el plasma son las muestras representativas. Usando la sangre total nos aseguramos de que tanto los tóxicos que se encuentran en los eritrocitos como los que se unen a proteínas van a estar en la muestra a analizar (19,20).

2.3 ENVASADO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

La cantidad de muestra de orina va a ser como mínimo 50 mL para la investigación toxicológica general y la posterior confirmación y cuantificación. En cuanto a la muestra de sangre será un mínimo de 20 mL.

Las muestras deben ser introducidas en recipientes adecuados a ser posible de un sólo uso para evitar la contaminación. De no ser así, deben estar perfectamente limpios y secos. La muestra de orina debe recogerse en un envase de plástico, boca ancha, hermético con tapón de rosca, la sangre debe ser recolectada en tubos de vidrio o plástico con tapón. Debe evitarse el uso de tapones de goma o material similar, ya que pueden absorber algunas sustancias o contaminar las muestras.

Las muestras destinadas al análisis no deben contener conservadores que puedan interferir en el análisis posterior. No obstante si se considera necesario utilizarlos, el conservador ideal es la azida sódica (0.1% p/v) para orina y si se requiere de un anticoagulante el más recomendable el fluoruro sódico (1% p/v) que también es un preservador antibacteriano (19,21).

2.4 ANÁLISIS QUÍMICO – TOXICOLÓGICO

Una vez que la muestra ha llegado al laboratorio comienza la investigación toxicológica propiamente dicha, en la que pueden darse dos situaciones: que se conozca la naturaleza del tóxico implicado o que el tóxico sea desconocido. En el primer caso se puede utilizar directamente métodos específicos para la identificación y cuantificación, sin embargo es mucho más frecuente encontrarse frente a una muestra en la que no se conoce si contiene alguna sustancia tóxica, lo cual exige seguir una metodología completa y en muchos casos compleja para llevar a buen término el análisis (14,18). Debido a esto las fases involucradas son: 1) preparación de la muestra, 2) separación o extracción del tóxico en la muestra, 3) detección e Identificación y 4) cuantificación del tóxico.

CAPITULO 3

DETERMINACIÓN DE BENZODIAZEPINAS EN MUESTRAS DE ORINA Y SANGRE

La detección de sustancias químicas en fluidos biológicos no es tarea fácil, esto se debe principalmente a los cambios (biotransformación) que sufren las sustancias en el organismo y que dan lugar a entidades químicas diferentes que limitan la detección de la droga como tal.

Las benzodiazepinas sufren tales cambios en el organismo que en consecuencia aparecen en orina y sangre como oxazepan, nordiazepan (metabolitos que resultan de gran interés para su detección). Manifiestar la presencia o ausencia de las benzodiazepinas y/o sus metabolitos en muestras biológicas requiere en general de técnicas analíticas presuntivas y de confirmación relativamente sofisticadas, sin pasar antes por una preparación de la muestra así como de una separación o extracción del tóxico en la muestra (22,23).

Pruebas Orientativas / Presuntivas

- a) Prueba Bratton Marshall
- b) Cromatografía en Capa Fina
- c) Métodos de Inmunoensayo

Pruebas Confirmatorias

- d) Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.
- e) Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas

3.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Este paso es crucial en el análisis, debido a la complejidad de las muestras biológicas. Como ya se ha mencionado al ser excretadas fundamentalmente conjugadas con el ácido glucorónico dá lugar a metabolitos que no son posibles de detectar; por lo que la hidrólisis va a dar lugar a la benzofenona correspondiente que permitirá la identificación y cuantificación.

La hidrólisis ácida ó enzimática es importante para el proceso de identificación de benzodiazepinas.

3.1.1 HIDRÓLISIS PREVIA A LA EXTRACCIÓN

Hidrólisis Ácida: la hidrólisis ácida se efectúa añadiendo 3 mL de ácido clorhídrico concentrado por cada 10 mL de orina o sangre y se coloca en un baño a 100° C por 30 minutos.

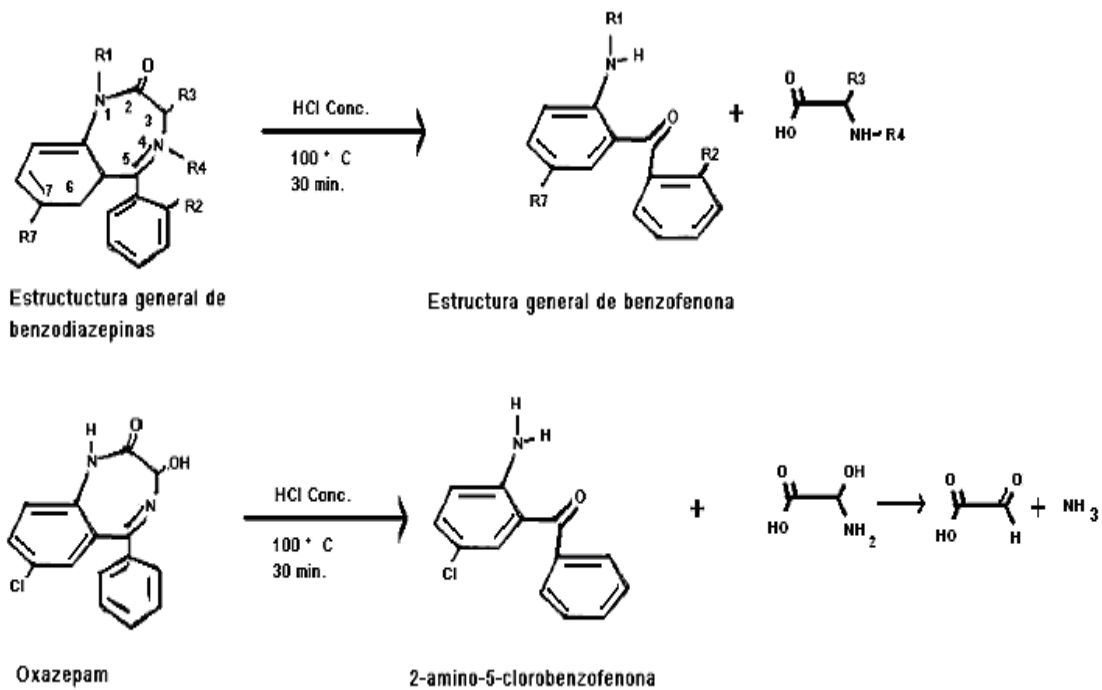


Fig. 4 Reacción de hidrólisis de benzodiazepinas.

Hidrólisis Enzimática con β-Glucuronidasa: se efectúa con 10 mL de orina o sangre que se ajusta a pH 7 si es necesario (con ácido acético) y se le añade 0,1 mL de un buffer pH 5,5 (buffer acetato de sodio-ácido acético 0,1 M) por cada mL de orina. Se incuba a 37° C por 24 horas ó a 55° C por una hora.

En ambos casos se deja enfriar y se somete a los métodos de extracción disponibles (24).

3.2 EXTRACCIÓN DE BENZODIAZEPINAS

Si se tiene en cuenta que muestras de orina y sangre son muestras biológicas complejas, la extracción va a ser una operación fundamental para el éxito en el análisis toxicológico.

Si el tóxico no se extrae adecuadamente de la matriz orgánica que lo contiene, será inútil utilizar sofisticadas técnicas para la detección y cuantificación.

Las extracciones pueden ser en fase sólida o extracciones líquido-líquido. La extracción en fase sólida como método alternativo a la extracción líquido-líquido utiliza columnas que para el aislamiento tiene grandes ventajas tales como son los altos recobros además de la obtención de un extracto puro y concentrado.

De manera general el procedimiento fundamental es: acondicionamiento de la columna, aplicación de la muestra, lavado de la columna, ajuste de pH si lo requiere, secado de la columna, elusión de la droga y concentración del extracto. El principio es el mismo que utiliza la cromatografía de alta resolución. En el paso de acondicionamiento el disolvente abre las cadenas hidrocarbonadas lo que permite el incremento del área para una mejor interacción con el analito. El lavado tiene como función remover selectivamente los compuestos endógenos de la matriz biológica para una elusión posterior y obtener un extracto limpio.

A continuación se presentan algunos métodos de extracción en muestras de orina y sangre (14).

Métodos para la Extracción de Benzodiazepinas en Orina

Método 1. Se miden 10 mL de orina y se ajustan a pH 3 con ácido fosfórico o tartárico, se extrae dos veces con 30 mL de éter etílico y se combinan los extractos, se lava con 5 mL de agua, la fase acuosa se adiciona a la muestra y se retiene para posterior extracción. El extracto etéreo se lava con 5 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio, y dicha solución después se separa y se conserva para el análisis de posibles silicatos. En el extracto etéreo se pueden encontrar drogas neutras y ácidas. La muestra inicial retenida se ajusta a pH 8 con amoníaco diluido y se extrae dos veces

con 10 mL de cloroformo, se reúnen los extractos se filtra a través de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y se concentra. Este extracto puede contener benzodiazepinas.

Método II. Se miden 10 mL de orina los cuales se ajustan a pH 8–9 con hidróxido de potasio 1M y se realiza una extracción en fase sólida con columnas Bond-Elut-TCA. Las columnas se activan y acondicionan con una mezcla de metanol/ 0,6% de dietilamina y con una mezcla de solución acuosa de bicarbonato potásico/ 10% acetonitrilo. Se decantan las muestras de orina en las columnas, después de la aplicación de la muestra, las columnas se lavan con una mezcla de agua/acetonitrilo (80:20), seguidamente con agua. El analito de la columna se eluye utilizando metanol. El extracto resultante se evapora a sequedad.

Las recuperaciones con columnas comerciales son altas además de la obtención de un extracto puro y concentrado.

Nota: el método I es utilizado no sólo para la extracción de benzodiazepinas sino también para drogas ácidas, neutras así como silicatos en muestra de orina.

Métodos para la Extracción de Benzodiazepinas en Sangre

Método I. A 10 mL de sangre se agregan 5 mL de buffer de fosfatos pH 7,4 se extrae con 50 mL de cloroformo, se desecha la fase acuosa, mientras que la fase clorofórmica (fase orgánica) se lava con 10 mL de ácido clorhídrico 0,1N, después se lava con 10 mL de hidróxido de sodio 0,13N, finalmente se separa la fase clorofórmica y se evapora a sequedad.

Método II. A 5 mL de sangre se le añaden 20 mL de solución fisiológica (cloruro de sodio 0.9%), se homogeneiza y se deja reposar cinco minutos, después se centrifuga por 10 minutos a 2500 rpm. La columna (SEP-PAK C18) se activa pasando 5 mL de metanol y 5 mL de solución fisiológica, se le aplica presión pero no se deja secar la columna, se añade la sangre previamente filtrada si es necesario. El lavado de la columna se realiza con solución fisiológica y se deja secar ligeramente, posteriormente se adiciona 5 mL de pentanol (para arrastrar el colesterol) y se deja secar la columna 15 minutos a una presión 15 mmHg. La elución se lleva a cabo con 5 mL de una mezcla de cloroformo-metanol 1:1, la cual se desecha, pasándose después 4 fracciones de 1 mL (mezcla cloroformo- metanol) cada una de las cuales se reúnen y se evapora a sequedad.

Método III. Se miden 2 mL de sangre, se alcalinizan con amoníaco y se extrae con 7 mL de una mezcla de cloruro de butilo, éter etílico (80:20). Agitar por tres minutos y centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos, separar la fase orgánica y depositarla en un tubo para centrifugar; agregar 2,5 mL de ácido sulfúrico 2,5 N, agitar por tres minutos y centrifugar por 10 minutos. Desechar la fase orgánica, adicionar 2 mL de hexano a la fase acuosa, agitar nuevamente dos minutos y centrifugar por 10 minutos. Desechar el hexano, alcalinizar la fase acuosa con amoníaco a pH 9 y extraer con 4 mL de acetato de etilo. Se separa la fase orgánica y se evapora a sequedad (14,24).

Posteriormente los extractos de orina o sangre son sometidas a pruebas presuntivas (colorimétricas, cromatográficas, enzimoimmunoanalíticas). Los resultados positivos son confirmados mediante pruebas confirmatorias.

3.3 PRUEBAS PRESUNTIVAS PARA LA DETECCIÓN BENZODIAZEPINAS

Las pruebas presuntivas ayudan a dirigir la búsqueda analítica; una de ellas es a través de pruebas colorimétricas ya que multitud de sustancias dan lugar a una coloración cuando se mezclan con ciertos reactivos químicos. En algunas ocasiones el color puede ser específico de un compuesto, pero la mayor parte de los casos, la reacción es producida por varios compuestos clasificados en un determinado grupo en función a su estructura química.

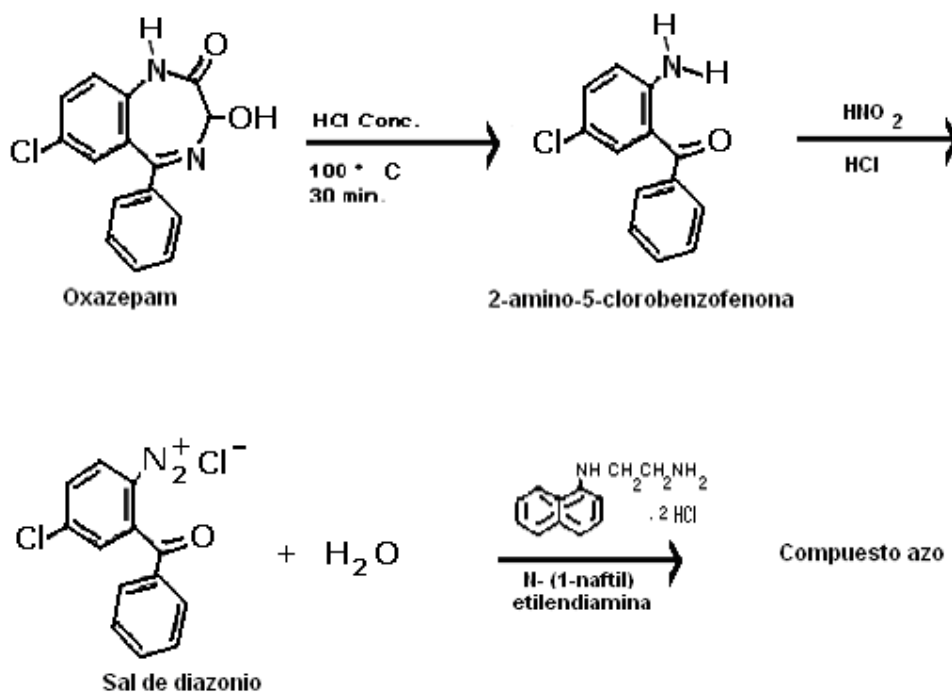
El color puede variar dependiendo de:

- a) Las condiciones de reacción.
- b) La cantidad de la muestra y la presencia de sustancias extrañas.

Cuando la sustancia contiene más de una sustancia o la droga es coloreada se puede obtener una mezcla de colores, por lo que es aconsejable realizar una separación cromatográfica y posteriormente la reacción colorida con los reveladores adecuados (24).

3.3.1 Prueba Bratton Marshall

El principio consiste en que la amina presente en la benzofenona derivada de la hidrólisis de las benzodiazepinas, se puede diazotizar usando ácido nitroso (preparado a partir del nitrito de sodio y de ácido clorhídrico). La sal de diazonio formada se hace reaccionar con el clorhidrato de *N*-1-naftiletilendiamina para formar un compuesto azo (42).



Procedimiento

Se reconstituye el concentrado resultante de la extracción en orina en 5 mL de ácido clorhídrico 6N.

Se rotulan dos tubo (blanco y muestra) los cuales se adicionan a cada uno 1 mL del extracto clorhídrico, 2 mL de ácido clorhídrico 6N, 2 mL de agua destilada, agregando únicamente al tubo de la muestra 0,1 mL de nitrito de sodio 0,1%. Agitar ambos tubos y colocar sobre baño de hielo por tres minutos. Transcurrido el tiempo adicionar a ambos tubos 0,5 mL de sulfamato de amonio 0,5% esperar 10 minutos, con agitación adicionar 0,5 mL de naftiletilendiamina 0,1%, agitar y observar el color. Una reacción

positiva se traduce en la aparición de color rosa-violeta, el cual se desarrolla lentamente, más rápidamente si se calienta a 60° C por cinco minutos.

Nota: de las benzodiazepinas, solamente el nitrazepam puede ser determinado directamente de orina. No dan esta reacción el triazolam, alprazolam y clobazam por tener sustituyentes que no permiten que se forme la benzofenona correspondiente (25).

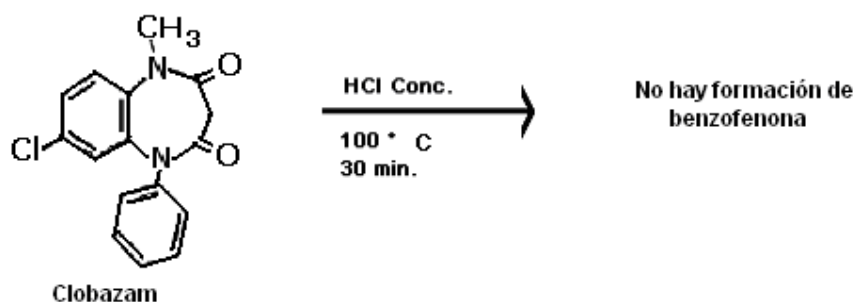


Fig. 5. Clobazam: benzodiazepina que por su estructura no forma su correspondiente benzofenona.

3.3.2 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

La cromatografía es un método muy sencillo y barato que no requiere de personal especializado para realizarla, permite separar los componentes de una mezcla por distribución entre dos fases, una de las cuales es móvil y la otra estacionaria. La fase estacionaria es un sólido y la fase móvil es un líquido (26).

No hay ninguna prueba de color fiable para la detección de estos compuestos. Sin embargo como ya se ha mencionado, la hidrólisis de la mayoría de las benzodiazepinas y su conjugado da lugar a benzofenonas que pueden extraerse y analizarse por cromatografía de capa fina y confirmar su presencia utilizando patrones de referencia para la identificación.

Muestra: después de la hidrólisis, se reconstituye el concentrado obtenido en la extracción y aplican 20 µL de muestra.

Sistema Cromatográfico No 1

(Para determinación de benzodiazepinas, alcaloides, fenotiazinas etc.)

Fase móvil: cloroformo, metanol (90:10)

Fase estacionaria: Sílica gel HF-254

Referencia Std: metabolitos de la benzodiazepinas / benzofenonas

Revelador: Dragendorff atomizado

Las manchas detectadas son de color naranja

Sistema Cromatográfico No 2

Fase móvil: cloroformo, acetona (90:10)

Fase estacionaria: Sílica Gel 60F-254 mm de 25 mm de espesor

Referencia Std: metabolitos de la benzodiazepinas / benzofenonas a una concentración de 0,1 mg/mL en ácido clorhídrico 1M

Revelador: el relevado se realiza exponiendo la placa a la luz UV, se revela con nitrito de sodio 0,5% en ácido clorhídrico 1N y después con difenilamina al 0,5% en agua

Las manchas detectadas son de color rosa.

Sistema Cromatográfico No 3

Fase móvil: tolueno

Fase estacionaria: Sílica Gel 60F-254 mm de 25 mm de espesor

Referencia Std: metabolitos de la benzodiazepinas / benzofenonas

Revelador: los reactivos se atomizan en el orden que aparecen, pero antes del reactivo cuatro la placa debe secarse con aire caliente.

1. Ácido sulfúrico 9M
2. Nitrito de sodio al 1% en agua
3. Difenilamina al 0,5% en agua
4. Clorhidrato de N- (1-naftil) etilendiamina en agua acetona (8.7:2)

Nota: las manchas pueden visualizarse a la luz ultravioleta, antes del revelado (27,28).

3.3.3 ENSAYOS INMUNOLÓGICOS

Los ensayos inmunológicos (EI) constituyen uno de los métodos que se emplean con frecuencia para fines de detección. En este tipo de ensayos el metabolito del fármaco presente en la muestras del paciente compite contra un fármaco marcado por un número limitado de sitios de enlace en los anticuerpos específicos para el fármaco que

se está analizando; el fármaco marcado en el ensayo inmunológico lleva un radioisótopo, una enzima o un compuesto fluorescente. Los ensayos inmunológicos incluyen ensayo radioinmunológico (RIA), técnica de ensayo inmunológico por multiplicación enzimática (EMIT) y ensayo inmunológico por polarización fluorescente (FPIA). Los métodos EMIT y FPIA no necesitan muestras con tratamiento previo, son sensibles en el rango de microgramos a nanogramos por mililitro, además de que proporcionan resultados rápidos en caso de urgencia y están adaptados para uso en instrumentos automatizados (27,28).

Cabe mencionar que inmunoensayos en presentación de Kits también son sensibles, no necesitan muestras con tratamiento pero la interpretación del resultado resulta ser complicado puesto que es en base a un color además de que es específico solo para un compuesto en particular.

Técnica de Ensayo Inmunológico por Multiplicación Enzimática (EMIT)

El método EMIT de Syva Company (Palo Alto, C.A.) es empleado por ser altamente sensible y específico para diferentes clases de drogas, para un ensayo o muestra en particular. Son las pruebas más utilizadas para la detección de drogas de abuso en muestras de orina en la que se utiliza una cantidad pequeña de muestra. Las muestras de orina son analizadas mediante el reactivo EMIT® std.

El principio del ensayo inmunológico por multiplicación de enzimas consiste en que es posible determinar la cantidad de interacción entre la droga y el anticuerpo utilizando un marcador enzimático; se basa en una reacción de enlace competitivo entre la droga de la muestra y la droga marcada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en un número limitado de sitios de enlace con el anticuerpo; el enlace del anticuerpo a la droga marcada con la enzima produce inhibición de la actividad enzimática, esta inhibición se debe a que el anticuerpo interfiere estéricamente con el enlace del sustrato con el sitio catalítico de la enzima o el enlace del anticuerpo transforma la configuración de la enzima. La cantidad de droga en la muestra problema determina el número de sitios para anticuerpos disponibles para enlazar e inactivar la droga marcada con la enzima; a medida que hay más droga en la muestra, hay menos anticuerpo disponible para inhibir la actividad enzimática, por lo tanto el cambio de color que se observa es directamente proporcional a la cantidad de droga en la muestra problema (Fig. 6).

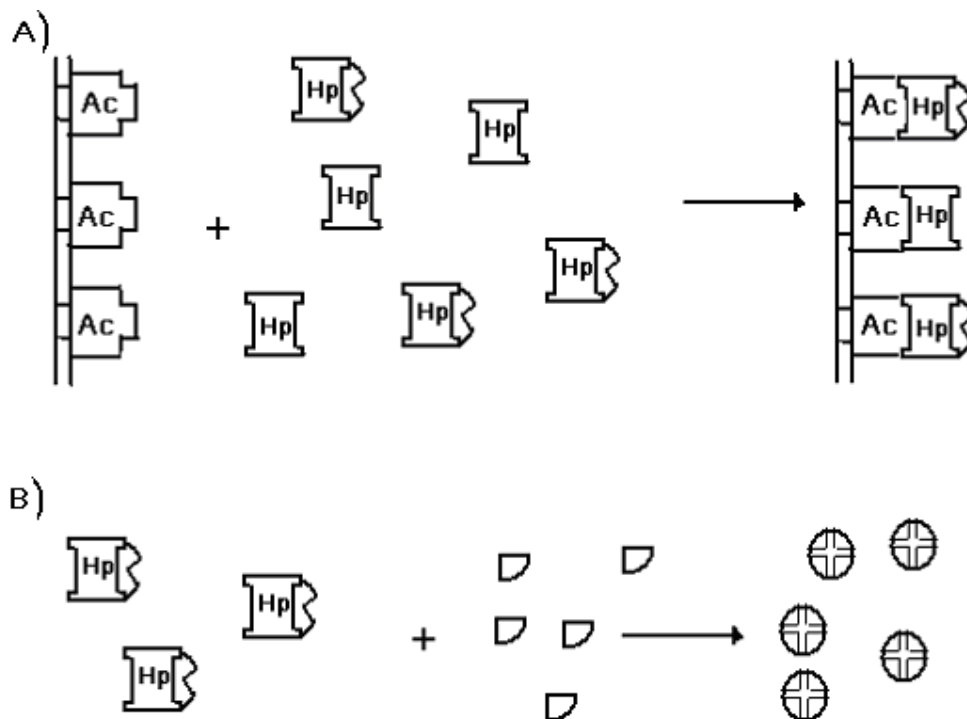


Fig. 6. Prueba EMIT. A) Una droga (Hp) y una droga conjugada con una enzima (Enz), compiten por un número limitado de sitios de enlace con el anticuerpo (Ac) en un tubo recubierto, y dan lugar a la formación de complejos droga-anticuerpo. B) al agregar sustrato, la enzima que se encuentra en la droga conjugada libre, transforma el sustrato en un producto medible (⊕) (43).

Reactivos

Los tubos recubiertos con anticuerpo son soportes sólidos específicos para un fármaco y/o sus metabolitos. El marcador utilizado frecuentemente es la enzima deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato.

El sustrato enzimático es glucosa-6-fosfato y la coenzima nicotinamida-adenin-dinucleotido (NAD). La reacción enzimática hace que la coenzima se reduzca a nicotinamida-adenin-dinucleótido (NADH) producto final medible que produce un cambio de absorción a una determinada longitud de onda.

Comparando este cambio de absorbancia con el de una muestra conocida que contenga el metabolito de la droga, se puede determinar la presencia de la misma en la muestra (31,43).

Los análisis de orina por el método EMIT están diseñados para ser cualitativos y no deben utilizarse para determinar la concentración de fármaco en la muestra, el resultado se reporta como positivo o negativo.

Prueba de Benzodiazepinas SureStep™ BZO

La prueba BZO en un sólo paso para muestras de orina es un ensayo inmunológico basado en el principio de uniones competitivas para la detección de oxazepam (metabolito principal) además de otros compuestos relacionados con las benzodiazepinas en orina en concentraciones con límites (cut-off) de 300 ng/mL. La droga que puede estar presente en la muestra de orina compite frente al conjugado de la misma en los puntos de unión al anticuerpo.

Esta prueba contiene anticuerpos monoclonales de ratón anti-oxazepam (oxazepam unido a partículas y conjugado de proteína).

Durante la prueba, la muestra de orina migra por acción capilar. Si las benzodiazepinas están presentes en la orina en concentraciones inferiores a la del punto de corte (cut-off), no saturarán los puntos de unión de los anticuerpos. Las partículas recubiertas de anticuerpo serán capturadas por el conjugado inmovilizado de proteína-oxazepam línea visible de color aparecerá en la zona de la prueba. Esta línea de color no se formará en la zona de la prueba si el nivel de benzodiazepinas está por encima de la del punto de corte (cut-off) por que saturará todos los puntos de unión de los anticuerpos de anti-oxazepam. Una muestra de orina positiva no generará una línea coloreada en la zona de la prueba debido a la competencia de la droga, mientras que una muestra de orina negativa o una muestra con concentración inferior a la del límite (cut-off) generará una línea en la zona de la prueba. Para servir como procedimiento de control, una línea de color aparecerá siempre en la zona de control si la prueba ha sido realizada correctamente y con un volumen adecuado de muestra (100 µl) (32).

3.4 PRUEBAS CONFIRMATIVAS POR EXCELENCIA

La prueba confirmativa por excelencia es aquella que emplea el equipo de Espectrometría de masas acoplada con una cromatografía tal como la cromatografía de gases (CG-MS) y la líquida de alta presión (LC/MS).

La Espectrometría de Masas es una técnica micro analítica instrumental que requiere sólo unos pocos nanomoles de muestras para obtener una información sustancial relacionada con la estructura y peso molecular del analito (27,32), la técnica esta basada en el diferente comportamiento que presentan los iones que se forman por la variedad de técnicas de ionización, al atravesar campos eléctricos y magnéticos. Así dichos iones son separados en función de su relación masa/carga (m/z) y detectados, resultando así el espectro de masa, que se puede considerar como la huella dactilar de la molécula en cuestión (14,33).

3.4.1 Propuesta 1. Determinación de Benzodiazepinas por CG-MS

Después de la hidrólisis de la muestra de orina con β -glucuronidasa y una extracción, es esencial someter la muestra a procesos de derivación química, antes de proceder al análisis cromatográfico. De este modo se mejoran las fracciones iónicas y se logran obtener iones característicos lo que permite la estabilidad de las moléculas en el proceso de separación por cromatografía, además de evitar la descomposición térmica.

El análisis se efectúa mediante CG/MS con extractos derivados de *N,O*-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) conteniendo un 1% de trimetilclorosilano (TMCS) (agentes utilizados para procesos de derivación química) y como estándar interno *N*-metilclonazepam bajo las siguientes condiciones cromatográficas (34):

CG (HP-5890) acoplado a espectro de masas (HP-5973)

Columna: Heliflex® AT-5ms, 30 m x 0.25 mm 0.25 μ m

Temperatura: 240 ° C (0 min.) – 315° (5 min.) a 10° C/min.

Gas acarreador: Helio a 0.8 mL/min (29 cm/s)

Detector: Detector selectivo de masas (MSD) a 325° C

Modo Scan (m/z 50-500)

Bajo estas condiciones se identifican picos de compuestos trimetilsililados (TMS) mostrados en el cromatograma de la Fig. 7

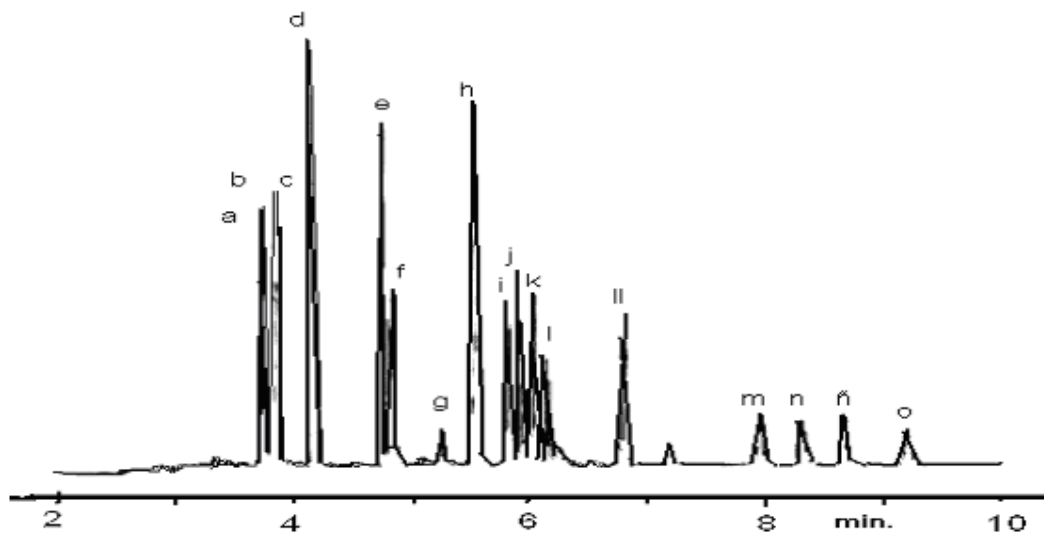


Fig. 7 Cromatograma de benzodiazepinas en orina: identificación de los picos (como derivados TMS): a. Desalquilflurazepam, b. Nordiazepam, c. Halazepam, d. Oxazepam, e. Lorazepam, f. Diazepam, g. Clordiazepóxido, h. Temazepam, i. Flunitrazepam, j. Clonazepam, k. Prazepam, l. 7-Amino-flunitrazepam, II. N-metilclonazepam, m. Alprazolam, n. Alfa-hidroxiaprazolam, ñ. Triazolam, o. alfa-hidroxitriazolam (34).

En el análisis espectral se observan iones de algunas benzodiazepinas. (Fig. 8)

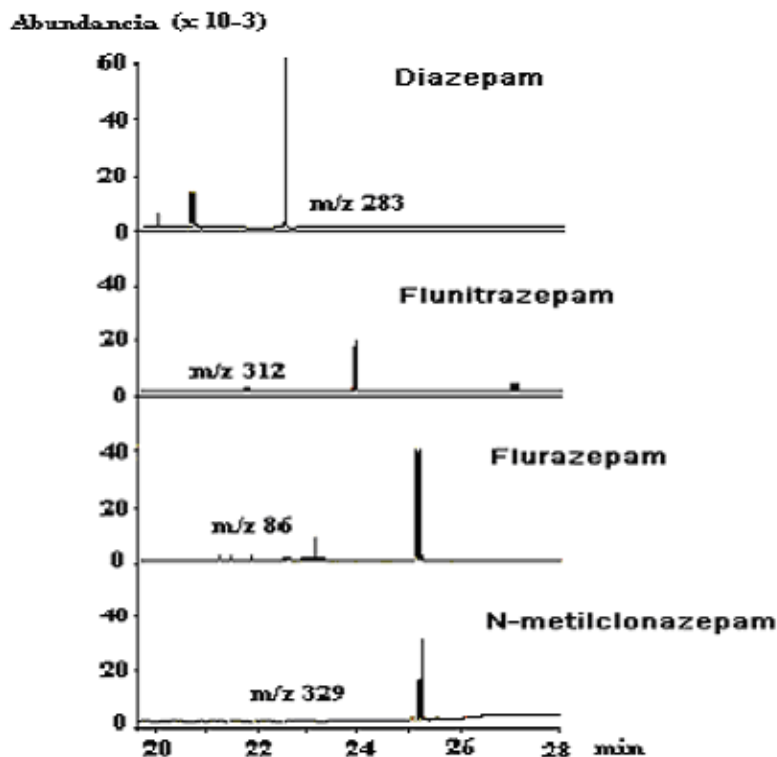


Fig. 8 Espectro de masas de benzodiazepinas (34).

3.4.2. Propuesta 2. Determinación de benzodiazepinas en plasma por LC-MS/MS

La tecnología de la Cromatografía Líquida – Espectrofotometría de masas (LC/MS) abre una nueva perspectiva para los análisis espectrométricos eficientes. Esta técnica, que en muchos casos utiliza detectores espectrométricos multi-masas, puede ser utilizada potencialmente para medir un amplio rango de analitos, sin limitaciones de masa molecular, con una preparación de la muestra en forma simple, sin necesidad de una derivación química (35).

La siguiente técnica se realiza por cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masa en cadena (LC-MS/MS). El espectrómetro de masas en cadena es un instrumento especializado que detecta moléculas midiendo su peso (masa) electrónicamente y presentan los resultados en la forma de espectro de masas. Un espectro de masas es una gráfica que muestra cada molécula específica por peso y cantidad de moléculas presentes.

Una vez que las muestras biológicas fueron sometidas a proceso de extracción, la detección se realiza bajo las siguientes condiciones (36):

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Waters Alliance 2695

Columna: XTerraMS C18, 3.5µm, 2.1 x 100 mm.

Precolumna: C18 (1mm), Temp.: 26° C

Flujo: 0.2 mL/min.

Fase móvil: Acetonitrilo/Ácido fórmico 0.1%

Espectrómetro de Masas Micromass Quattro Micro tandem mass spectrometer

Ionización realizada con electrospray en modo positivo (ESI+)

Presión en celula de colisión: 0.3 Pa de Argón

Gas nebulizador: Nitrógeno

Temperatura desolvatación: 350° C

Temperatura de la fuente: 120° C

Modo de barrido para cuantificación: Multiple reaction monitoring (MRM)

En el análisis espectral se observan iones característicos y tiempos de retención de algunas benzodiazepinas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Iones característicos y tiempos de retención de benzodiazepinas

Compuesto	Tiempo de retención (min.)	Ion primarios (m/z)	Iones secundarios (m/z)	Colisión (eV)
Tetrazepam	11.03	289.2	225.2	26
			253.2	22
Diazepam	12.01	290.2	154.1	30
			198.3	30

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado las problemáticas de nuestra sociedad que ha afectado al ser humano y conllevado al consumo elevado de benzodiazepinas, se pretende documentar técnicas analíticas que abarque pruebas para la identificación y cuantificación así como el tratamiento de muestras de sangre y orina puesto que estas no sólo están implicadas en el aspecto terapéutico sino también en el aspecto legal, dada su naturaleza farmacológica que ejercen en el organismo estas se han encontrado en casos de intoxicación ya sea voluntarias, las cuales pueden llegar a ocasionar la muerte cuando se esta en combinación con alcohol o fármacos depresores del Sistema Nervioso Central o involuntarias, que frecuentemente se han relacionado con asaltos sexuales no forzados que en muchos casos queda impune.

Por lo antes mencionado el presente trabajo tiene como objetivo realizar una investigación documental que cuente con los fundamentos de las técnicas de pruebas presuntivas y confirmatorias para benzodiazepinas, manipulación y tratamiento de muestras biológicas así como consideraciones que hay que tener presentes como lo son los pasos críticos en las técnicas.

4. OBJETIVOS

General:

Realizar una investigación documental de los fundamentos de técnicas para la determinación de benzodiazepinas en orina y sangre, propiedades químico farmacológicas así como pasos críticos en los procesos del análisis, para proporcionar información tanto a personal capacitado como a personal sin conocimientos referentes al tema.

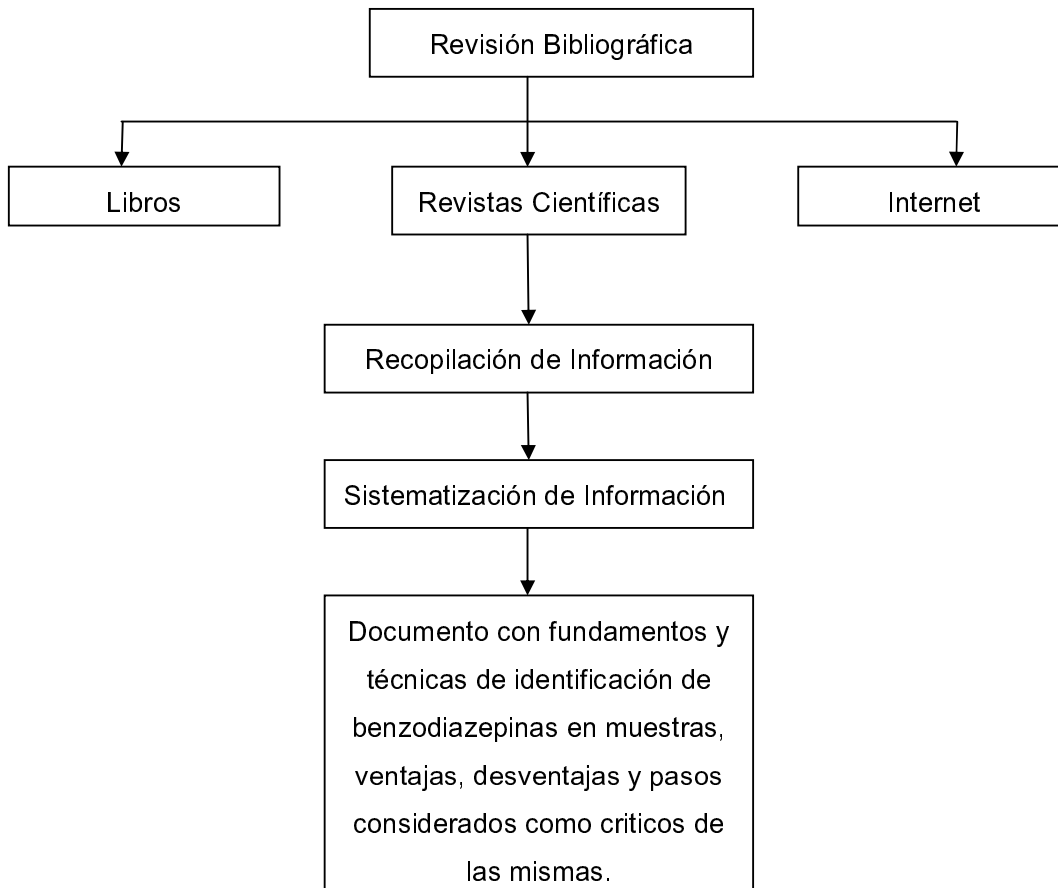
Específicos:

Recabar información de fundamentos de las técnicas presuntivas y confirmatorias utilizadas para la determinación de benzodiazepinas describiendo algunas técnicas analíticas como ejemplo.

Describir las ventajas y desventajas de las técnicas para la identificación y cuantificación para facilitar la elección de alguna de ellas de acuerdo a las necesidades circunstanciales.

Describir y hacer hincapié en los pasos que son considerados como críticos para el análisis de benzodiazepinas en las muestras de sangre y orina describiendo sus implicaciones.

5. DISEÑO METODOLÓGICO



6. RESULTADOS

Las muestras (fluidos biológicos) obtenidos de un sujeto vivo utilizadas con mayor frecuencia para el análisis químico-toxicológico son orina y sangre, a continuación se describen algunas consideraciones que hay que tener en cuenta para cada una de ellas.

Comparación de ventajas y desventajas de muestras biológicas.

Tipo de fluidos	Ventajas	Desventajas
Orina	La concentración del tóxico puede llegar a ser 100 veces mayor que en sangre. Exenta de proteínas. Se obtiene fácilmente y en cantidades suficientes.	Muchos tóxicos se eliminan por la vía renal. Fluido fácilmente adulterable con sustancias químicas.
Sangre	La mayor parte de los tóxicos van disueltas en el plasma o unidos a proteínas.	La toma de sangre requiere de personal capacitado. Obtener sangre en grandes cantidades.

El análisis químico es caracterizado esencialmente por la variedad de pruebas que existen, algunas de ellas emplean instrumentos complejos capaces de medir propiedades físicas o químicas, que permiten la identificación y cuantificación de los compuestos químicos. A continuación se mencionan las técnicas más utilizadas para la identificación y cuantificación de benzodiazepinas en muestras de orina y sangre.

Técnicas para el análisis de benzodiazepinas en muestras de orina y sangre.

	Orina	Sangre
Técnicas de identificación	Colorimétricas	CCF
	CCF	EMIT
	EMIT	
Técnicas de cuantificación	GC/MS	GC/MS
	LC/MS	LC/MS

CCF, cromatografía en capa fina; EMIT, técnica de ensayo inmunológico por multiplicación enzimática; GC/MS, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; LC/MS, cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

Las técnicas de cuantificación presentan ventajas sobre las técnicas de identificación (pruebas presuntivas) aunque también tienen ciertas limitaciones que concretan su campo de aplicación, a continuación se mencionan algunas a considerar.

Comparación de técnicas utilizadas para la identificación benzodiazepinas

Técnicas	Ventajas	Desventajas
Colorimétricas	<p>Sencilla y rápida</p> <p>No requiere personal especializado</p> <p>Adecuado para cualquier laboratorio</p>	<p>La reacción no es específica para un compuesto.</p> <p>Sólo para identificación</p>
EI	<p>Rápida y sensible</p> <p>Poca muestra y sin tratamiento</p> <p>Puede ser manual o automatizada</p>	<p>Prueba específica solo para un compuesto</p>
CCF	<p>Sencilla y rápida</p> <p>No requiere personal especializado</p> <p>Adecuado para cualquier laboratorio</p> <p>Especificidad</p>	<p>Dificultad para la cuantificación por lo que sólo es para identificación</p>

Técnicas	Ventajas	Desventajas
GC/MS	<p>Rápida</p> <p>Excelente resolución y sensibilidad</p> <p>Identificación y cuantificación</p> <p>Poca muestra</p>	<p>Equipo costoso</p> <p>Requiere personal especializado</p> <p>No aplica a sustancias alterables térmicamente o de peso molecular elevado.</p>
LC/MS	<p>Rápida y excelente resolución</p> <p>Identificación y cuantificación</p> <p>Poca muestra</p> <p>No hay necesidad de derivación</p>	<p>Equipo costoso</p> <p>Requiere personal especializado</p>

CCF, cromatografía en capa fina; EI, ensayo inmunológico; GC/MS, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; LC/MS, cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

Comparación de ensayos inmunológicos

El	Ventajas	Desventajas
EMIT	Sensible Poca muestra Muestra sin tratamiento	Es automatizada Específico solo para un compuesto
Kits	Rápida Sensible Poca muestra Muestra sin tratamiento Manual	Generalmente para uso en muestras de orina Específico solo para un compuesto Costo elevado
RIA	Sensible Poca muestra Muestra sin tratamiento	Específico solo para un compuesto

EMIT, ensayo inmunológico por multiplicación enzimática; RIA, ensayo radioinmunológico.

Pasos críticos a considerar en las etapas de análisis para la identificación y cuantificación de benzodiazepinas.

Etapas	Paso crítico	Importancia	Consecuencia
Tratamiento de la muestra	Someter la muestra a Hidrólisis	Formación de benzofenonas	La estructura de la benzofenona obtenida facilita el análisis para las pruebas.
Separación del tóxico en la muestra	Extracción	Obtención del tóxico perfectamente aislado y libre de impurezas, así como una concentración del tóxico.	Facilita la detección del tóxico en los pasos siguientes del análisis. Será inútil utilizar sofisticadas técnicas para la identificación y cuantificación.
Cuantificación del tóxico por GC/MS	Proceso de Derivación de muestra	Mejorar las fracciones iónicas y obtener iones característicos.	Permite la estabilidad de moléculas en el proceso de separación por cromatografía, además de evitar la descomposición térmica.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La detección de benzodiazepinas en muestras biológicas es muy compleja, dada las circunstancias el tratamiento de la muestra es fundamental para las benzodiazepinas puesto que estas una vez administradas sufren cambios en el organismo dando lugar a metabolitos que son entidades químicamente diferentes que hace que para el análisis no sea posible la cuantificación de ellas de esta manera los procesos de hidrólisis se considera como un paso crítico porque de no llevarlo a cabo no se formara la correspondiente benzofenona que por su estructura permitirá la identificación y posterior cuantificación. La extracción se considera un paso crítico puesto que si el tóxico no se extrae adecuadamente de la muestra biológica que lo contiene será inútil utilizar sofisticadas técnicas para la detección y cuantificación razón por la cual el tóxico debe de estar perfectamente aislado y libre de impurezas. La derivación química es esencial en la cromatografía de gases antes de proceder al análisis, de no realizarlo las fracciones iónicas o iones característicos no mejoran lo que dará como resultado inestabilidad de las moléculas en el proceso de separación, además de la descomposición térmica.

En cuanto a las pruebas presuntivas que tienen la finalidad de poner en manifiesto la presencia o ausencia del tóxico están las calorimétricas, inmunológicas y cromatográficas en capa fina; la primera resulta ser rápida y sencilla, sin embargo su especificidad se ve afectada puesto que su reacción esta en base a grupos funcionales que pueden corresponder no solo a un compuesto sino a una gran variedad de ellos. Los ensayos inmunológicos y cromatografía en capa fina tienen mayores ventajas en cuanto a especificidad, sin embargo de estos dos últimos los ensayos inmunológicos tienden a ser mucho más específicos puesto que en dado caso se puede realizar una cuantificación del tóxico además de que como alternativa a la técnica se encuentran disponibles Kits comerciales que tienen como ventaja, no realizar un pretratamiento de la muestra; no así que generalmente están disponibles sólo para muestras de orina y resultan ser económicamente caros.

Las pruebas de cuantificación son básicamente la cromatografía de gases y de líquidos de alta resolución ambos acoplados a espectrometría de masas; se utilizan por excelencia dado ambas tienen sus alcances y limitaciones; así pues las ventajas de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas son la resolución que es la capacidad de separación de los componentes e indudablemente la

sensibilidad por detectar concentraciones mínimas de un tóxico, sin embargo esta tiene sus limitaciones en lo que se refiere a las características de la muestra para análisis tal como lo son los componentes poco volátiles, la derivación química que se les tiene que hacer la cual lleva tiempo, en cuanto a tiempo al realizar reacciones de derivación, en cuanto a uso no es tan factible porque se requiere de personal capacitado y económicamente es un equipo muy caro; en la actualidad se esta utilizando la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas que tienen las mismas ventajas en cuanto a separación y sensibilidad, sin embargo sus limitaciones están relacionadas básicamente con los altos costos de los disolventes, además de que también se requiere de personal especializado. Pese a las limitaciones que tienen cada una son la mejor elección para el análisis de una muestra biológica en los laboratorios sin dejar de lado a las pruebas presuntivas puesto que son sensibles y detectan gran número de compuestos.

8. CONCLUSIÓN

Se compilo información bibliográfica de los fundamentos de técnicas presuntivas y confirmatorias utilizadas frecuentemente para el análisis de benzodiazepinas en muestras de orina y sangre, de igual manera se describieron algunas técnicas como ejemplo.

Se describieron aspectos importantes de las benzodiazepinas de lo cuales se obtuvieron las ventajas y desventajas presentes en cada una de las técnicas, destacando de esta manera que el ensayo inmunológico es la técnica más fiable para la identificación presuntiva por su sensibilidad y eficacia, en cuanto a las técnicas para cuantificación, la que emplea cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es la mejor elección en cualquier laboratorio. Sin embargo ambas son complementarias.

Los pasos críticos descritos para el análisis de las benzodiazepinas pueden servir de apoyo para quien en algún momento este interesado a realizar prácticamente los procedimientos de identificación y cuantificación y no tenga presente las consideraciones llevando a un mal resultado y consecuentemente la perdida de tiempo, esfuerzo y dinero.

Así mismo la información metodológica y analítica comprendida en este texto puede servir de apoyo para quien en algún momento esté interesado en realizarlas así como para validar, verificar y optimizar las técnicas aquí descritas.

9. PROPUESTA

Se propone que con la información de la investigación documental se realice un manual de consulta para los profesionales puesto que no sólo cuenta con fundamentos de las técnicas sino también con información metodológica y analítica para la identificación y cuantificación de benzodiazepinas y que en un momento determinado puedan realizarse con el objeto de optimizar las técnicas descritas. Por supuesto, este manual no representará la única elección.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beyer H., Manual de química orgánica. España: Editorial Reverte S.A, 1987.
2. Montoya M., Toxicología clínica. 3ª ed. México: Editorial Méndez Editores, 2002.
3. Bevan J., Fundamentos de farmacología. 2ª ed. México 1982.
4. Joseph J., Toxicology a case oriented approach. Florida: Editorial CRC Press, 2002.
5. Remington G., Farmacia. Tomo 2. España: Editorial Médica Panamericana, 1999.
6. Katzung B G., Farmacología básica y clínica. 8ª ed. México: Editorial El Manual Moderno, 2002.
7. Velasco M C., Farmacología fundamental. México: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, 2003.
8. Asperheim, Farmacología, 8ª edición. Editorial Mc. Graw-Hill Interamericana. México 1996.
9. Cabrera B., Toxicología de los fármacos. España: Editorial Mosby Year Book, 1993.
10. Calabuig G., Medicina legal y toxicología. 6ª ed. Barcelona: Editorial Masson S.A., 2004.
11. Laredo J., Drogodependencias. Farmacología, patología, psicología y legislación. 2ª ed. España: Editorial Médica Panamericana, 2003.
12. Busto Ue., Factores de riesgo en el abuso y la dependencia a benzodiazepinas. Trastornos adictivos. Colombia: el Manual Moderno, 2001.
13. Goldgrank L, Lewin N., Toxicologic emergencies. 7ª ed. Nueva York: Editorial Mc Graw Hill, 2002.
14. Gisbert C Villanueva E., Medicina legal y toxicología. 3ª ed. Valencia: Editorial Saber, 1999.
15. Bernard K., Medicina forense de Simpson. 2ª ed. México: Editorial El Manual Moderno, 1999.
16. Saldivar L., Medicina legal. 17ª ed. México: Editorial Méndez Editores, 2004.
17. Romeral A., Tráfico y consumo de drogas. Aspectos penales y médico forenses. Granada: Editorial Comares, 1993.
18. Alvarez E, Rodríguez E. Sistemática utilizada en el centro nacional de toxicología, urgencia toxicológica: *Rev. Med.*, 2000;1:36-40

19. Monteiro G, Ali R, Farrell M. Revisión de los indicadores biológicos de uso ilegal de drogas, consideraciones prácticas y utilidad clínica: *Rev. Toxicom.*, 2001; 28:279-1298.
20. Klaassen C, Waatkins J., Toxicología analítica y forense. Fundamentos de toxicología. Madrid: Editorial McGraw-Hill, Interamericana, 2005.
21. Mayorga F., Análisis en toxicología forense. Toxicología. 4ª ed. Colombia: el Manual Moderno, 2001.
22. Locani O, Lorenzo J., El laboratorio de toxicología y química legal: *Cua. Med. Forense*, 2004; 3(2): 127-135.
23. Nacional Institute of Drug Abuse. [sede Web] diciembre 2008. Benzodiazepinas. Disponible en: <http://www.nida.nih.gov/onfofax>.
24. Kenneth G, Furton. Trends in techniques for the extraction of drugs and pesticides from biological specimens prior to chromatographic separation and detection: *Anal Toxicol.*1991; 15:71-81.
25. Pruebas para la detección de drogas. [sede Web] diciembre 2008. Detección de drogas en muestras biológicas. Disponible en: <http://www.diinsel.com/reporthtml>.
26. Villanueva E, Cañadas A., Investigación toxicológica en medicina legal y toxicología. 4a ed. editorialMasson Salvat.
27. Barceloux E, Medical toxicology diagnosis and treatment of human Poisoning. United State of America: Editorialr Elsevier, 1994.
28. Martínez M C., Manual de Prácticas de Laboratorio de Toxicología. Unidad Docente Interdisciplinaria y Ciencias Químicas. Xalapa, 1987.
29. Zambrano A, Díaz S., El radioinmunoanálisis y su control de calidad. 1ª edición México, D.F.: Editorial Impretei, 1996.
30. Voguel J, Hednelt C., Detection of drugs in blood, bile and tissues with an enzyme inmunoassay technique: *J Anal Toxicol.* 1991; 5: 307-309.
31. Test de benzodiazepines. [sede Web] octubre 2008. Prueba en muestras de orina. Disponible en <http://datest.com/peajes/unites.sf/es>.
32. Cody J, Rodger JF. GC/MS analyses of Body Fluids for Drug of Abuse CRC. Press Inc. 1995.
33. Pomilio A, Vitale A. Técnicas para determinación cualitativa y cuantitativa de drogas de abuso en fluidos biológicos: *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2006; 40 (3)

34. Martínez C, Mayoral E. Análisis toxicológico sistemático. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. C-MS/MS. [revista en internet] 2007. [octubre 2008]. Disponible en <http://www.revistacicpc.com/revistas/cicpc20/pdf>.
35. Villain M, Pépin G. Determination of bromazepam and metabolites after a single intake in urine and plasma by LC-MS/MS. Application to forensic cases of drug facilitated crimes: *Forensic Sci Int*. 2004; 145:123-130.
36. López RM. Sumisión química: antecedentes, situación actual y perspectives. [revista en internet] 2003. [febrero del 2009]. Disponible en: <http://aetox.es/revista/revtox/metodología.pdf>.
37. Simpson D, Braithwaite R, Jarvie D. et al. Screening of drugs of abuse: cannabinoids, buprenorphine, methadone, barbiturates, benzodiazepines and other drugs: *Ann Clin Biochem*.1997; 34:460-510.
38. Beck O, Lin Z. The online screening for urinary benzodiazepines: comparison with Emit, FPIA and GC-MS: *J Anal Toxicol*. 1997; 21: 554-557.
39. Palencia A, Romero G. Las muestras en toxicología forense. Importancia de la cadena de custodia: *Revista de la facultad de Ciencia de la Salud*. Diciembre 2008;12 (3)
40. Drucker C. Fisiología médica. México: Editorial El Manual Moderno, 2005
41. Bratton AC and Marshall EK. A new coupling component for sulfanilamide determination: *J Biom Chem*. 1939; 128: 537-550.
42. Anderson C, Cockayne S Inmunología Clínica. México: Editorial Interamericana. Mc Graw-Hill, 1995.

GLOSARIO

Agonista. Agente que aumenta la transmisión sináptica o simula los efectos de un neurotransmisor natural.

Antagonista. Agente que bloquea la acción de un neurotransmisor.

Anticuerpo. Proteína producida por ciertas células en respuesta a un antígeno específico; el anticuerpo se une a dicho antígeno para neutralizarlo, inhibir o destruirlo.

Antígeno. Sustancia ajena al organismo huésped que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica, sin embargo hoy se acepta que los antígenos pueden ser no ajenos al organismo huésped, y que no necesariamente son capaces de activar la respuesta inmunitaria específica.

Apatía. Lentitud para reaccionar ante un estímulo.

Astenia. Ausencia o pérdida de la fuerza; debilidad, adinamia.

Ataxia. Incoordinación en la actividad muscular voluntaria, particularmente de los músculos que se emplean para actividades como caminar. Se debe a cualquier tipo de interferencia en las vías periféricas o centrales del sistema nervioso que tiene su control el balance de los movimientos musculares.

Disartria. Trastorno en la articulación de las palabras producido por cualquier lesión que afecta a la lengua o a los músculos del lenguaje.

Bradycardia. Lentitud del latido cardiaco con un promedio de contracciones del corazón menor de 60 por minuto.

Discinesia. Movimiento anormal o trastorno, especialmente los que se observan en los procedimientos que afectan el sistema extrapiramidal.

Distonia. Trastorno o falta de tonicidad.

Eosinófilo. Tipo de leucocito que se caracteriza por tener gránulos que se tiñen de rojo o rosa con colorante ácidos.

Eosinofilia. Aumento por encima de lo normal, del número de eosinófilos por unidad de volumen de sangre periférica.

Espasmo. Contracción fásica breve de una fibra muscular. Movimiento convulsivo.

Espasticidad. Trastorno caracterizado por espasmos. En neurología: un músculo débil, con incremento inicial en la resistencia al estiramiento pasivo, seguido de la relajación brusca.

Espástico. Contracción continua de un músculo o grupo muscular.

Estupor. El hecho de estar solo parcialmente conciente o sensible; insensibilidad acompañada de una disminución de los movimientos espontáneos.

Flebitis. Inflamación de una vena con o sin infección y formación de trombos.

Impulso nervioso. Onda de despolarización y repolarización que se propaga por sí sola a lo largo de la membrana plasmática de una neurona. También se le llama potencial de acción nerviosa.

Hiperreflexía. Entidad en la que los reflejos se encuentran aumentados por arriba de lo normal.

Hiperpolarización. Incremento de la negatividad interna transmembranal, con lo que se eleva el voltaje y se aleja del valor del umbral.

Hipnosis. Estado de conciencia alterados, de sueño o de trance.

Hipotonía. Disminución de la tonicidad o de la tensión normal; especialmente la disminución de la presión intraocular o del tono muscular.

Letargia. Somnolencia patológica o estupor, torpeza mental.

Libido. Suma total de todas las fuerzas instintivas, energía psíquica o impulso asociado por lo general con el placer.

Neurotransmisor. Diversas moléculas que se encuentran dentro de la terminales axónicas y se liberan hacia la hendidura sináptica en respuesta a un impulso nervioso; tiene efecto en el potencial de membrana de la neurona posináptica.

Nistamo. Movimiento de oscilación de los glóbulos oculares.

Obnubilación. Confusión mental, puede preceder a la pérdida de la conciencia.

Prurito. Comezón, sensación, molestia debido a la irritación de un nervio sensitivo periférico. Es un síntoma más que una enfermedad.

Sialorrea. Salivación abundante.

Trombocitopenia. Trastorno en el cual el número absoluto de plaquetas esta por debajo de lo normal.