

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE BENZOILECGONINA Y DELTA-9-
THC PRESENTES EN ORINA DEPENDIENDO DE LA
TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MENDOZA FUENTES BRENDA GUADALUPE

DIRECTOR DE TESIS: QFB LUCÍA DIMAS HERNANDEZ

ASESOR DE TESIS:

M. en C. VALENTÍN ISLAS PÉREZ





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

RESÚMEN

INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. ESTABILIDAD.....	1
1.1.1. Definición	1
1.1.2. Tipos de estabilidad	1
1.1.3. Estudios de Estabilidad	2
1.1.4. Factores que influyen	19
1.1.4.1. Ambientales.....	20
1.1.4.2. Relacionados con la muestra.....	20
1.1.4.3. Alteraciones físicas.....	24
1.1.4.4. Alteraciones Químicas.....	25
1.1.4.5. Alteraciones Microbiológicas.....	27
1.2. DROGADICCIÓN	28
1.2.1. Situación en México	28
1.2.2. Drogas de Abuso.....	29
1.2.2.1. Generalidades.....	29
1.2.2.1.1. Definición	29
1.2.2.1.2. Clasificación	30
1.2.2.1.3. Metabolitos.....	33
1.2.2.2. Cocaína.....	36
1.2.2.2.1. Benzoilecgonina.....	38
1.2.2.3. Cannabinoides.....	39
1.2.2.3.1. 11-nor-9-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol.....	41
1.3. FLUÍDO BIOLÓGICO.....	42
1.3.1. Definición.....	42
1.3.2. Tipos de Fluidos.....	43
1.3.3. Orina.....	44
1.4. MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE ESTABILIDAD.....	62
1.4.1. Cualitativo.....	62
1.4.2. Cuantitativo.....	64
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	68
3. OBJETIVO.....	69
4. HIPÓTESIS.....	70
5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	71
5.1. Tipo de estudio.....	71
5.2. Población.....	71
5.3. Criterios.....	71
5.3.1. Inclusión.....	71
5.3.2. Exclusión y eliminación.....	71
5.3.3. Limitaciones.....	71

6. METODOLOGÍA.....	72
7. RESULTADOS.....	79
7.1. Análisis cualitativo.....	79
7.1.1. Benzoilecgonina.....	79
7.1.1.1. Análisis de resultados cualitativos para BE.....	81
7.1.2. 11-nor-9-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol.....	82
7.1.2.1. Análisis de resultados cualitativos de THC.....	84
7.2. Cuantitativos.....	85
7.2.1. Benzoilecgonina.....	85
7.2.1.1. Analisis de resultados cuantitativos de BE.....	91
7.2.2. 11-nor-9-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol.....	93
7.2.2.1. Analisis de resultados cuantitativos de THC.....	96
8. CONCLUSIONES.....	97
9. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES.....	98
10. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	99
11. ANEXOS.....	100

DEDICATORIAS

A DIOS

A MIS PADRES:

CON EL MAYOR AGRADECIMIENTO POR SU APOYO PARA QUE YO LOGRARA TERMINAR MI CARRERA PROFESIONAL, SIN DEJARME RENUNCIAR BAJO NINGUN OBSTÁCULO.

A MI HERMANO:

QUE ME HA ENSEÑADO A INVESTIGAR POR MI CUENTA Y NO MANTENERME A LA ESPERA DE LOS DEMÁS.

A TODOS LOS SERES QUE HAN FORMADO PARTE DE MI VIDA, ¿A QUIEN MÁS SINO A ELLOS?:

QUE ME HAN ESPERADO DESPIERTA, ACOMPAÑADO EN DESVELOS Y EN LAS TRANSFORMACIONES POR LAS QUE HE PASADO PARA PODER SER LA PERSONA QUE SOY Y CONCLUIR UN CICLO MÁS EN MI VIDA.

A MIS ASESORES:

QFB LUCÍA DIMAS HERNÁNDEZ

M.C. VALENTÍN ISLAS PÉREZ

POR CADA UNO DE SUS CONSEJOS Y ASESORÍAS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A MI **ALMA MATER**:

UNAM

FES ZARAGOZA

POR SER ESA GRAN INSTITUCIÓN, EN LA QUE ME FORMÉ COMO PROFESIONISTA, COMPARTIENDO CONOCIMIENTOS Y EXPERIENCIAS, EN DONDE ENCONTRE EL CAMINO HACIA UN GRAN FUTURO; Y A TODOS AQUELLOS QUE FORMAN PARTE DE ELLA.

RESÚMEN

El objetivo de esta investigación fue establecer un esquema para las condiciones de almacenamiento de muestras de orina como producto para análisis de presencia de metabolitos 11-nor-9-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol y Benzoilecgonina, estudiando la estabilidad de las características químicas y físicas de las muestras de orina durante el almacenamiento en refrigeración (4°C) y en congelación (-20°C). Para tal fin fueron seleccionados 11 ejemplares de orina positivas a dos diferentes metabolitos (seis de Benzoilecgonina para Cocaína y cinco para 11-nor-9-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol perteneciente a Marihuana), de las cuales, a su vez aquellas derivadas de Cocaína se dividieron en dos grupos de concentración el primero de ellos con concentraciones dentro del rango 2000ng/ml a 12000 ng/ml, mientras que el segundo grupo con una concentración inicial de 40000 ng/ml a 110000 ng/ml; se fraccionaron dichas muestras en dos partes iguales, unas se almacenaron en refrigeración a 4°C las restantes a -20°C por 128 días. Aquellas pertenecientes a 11-nor-9-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol, únicamente se encontraron en un solo rango de concentración de 100 ng/ml a 350 ng/ml. A todas las almacenadas tanto en refrigeración y congelación se les realizaron evaluaciones de las características a los 0, 7, 14, 30, 90 y 180 días de almacenamiento. El esquema aplicado para procesar las muestras de 11-nor-9-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol, como producto refrigerado (4°C), se adaptó satisfactoriamente, permitiendo una buena estabilidad durante los primeros 90 días de almacenamiento; en cambio aquellas almacenadas a -20°C mostraron únicamente una estabilidad durante los primeros 30 días. El pH, la densidad y el precipitado presento un incremento de una unidad durante el periodo de estudio.

Con respecto a las muestras de Benzoilecgonina, en ambas condiciones se mantuvieron estables únicamente los primeros 30 días de análisis, mientras que el pH, la densidad y el precipitado aumentaron a lo largo del estudio, existiendo un incremento de aproximadamente 9 decimas de unidad hasta el día 180.

De esta manera se puede concluir que uno de los factores que influye en la estabilidad de las muestras es la concentración inicial, debido a que ha mayor concentración mayor degradación en almacenamiento a bajas temperaturas.

INTRODUCCIÓN

El uso de ciertas drogas ha estado presente en la historia de los pueblos desde épocas remotas, utilizadas como fármacos y enervantes para efectuar ciertos rituales, pero es importante precisar que en nuestro país se ha incrementado de modo acelerado el consumo de estas sustancias, volviéndose actualmente en un problema de salud y al mismo tiempo un fenómeno social. Durante gran parte de este proceso ha predominado la libertad para su producción, consumo y tráfico; existiendo la posibilidad de producir drogas en gran escala, su distribución se vuelve masiva y es de fácil acceso para toda la población.

La falta de expectativas, crisis económica, carencia de valores morales y otros factores han hecho que un gran porcentaje de consumidores de drogas sean menores de edad, que a temprana edad se vuelvan consumidores de sustancias tóxicas, convirtiéndose en individuos antisociales y delincuentes con pérdida de competencia y capacidad productiva además de sufrir daños irreversibles en su salud.

Es necesario mencionar que este problema afecta a sectores sociales amplios y tiene gran repercusión en los ámbitos de morbilidad y mortalidad con grandes implicaciones para la salud pública.

En la encuesta nacional sobre drogadicción del 2008 en México, las drogas con más preferencia son la marihuana seguida de la cocaína, motivo por el cual fueron seleccionadas para desarrollar el presente estudio, con la finalidad de proporcionar a los laboratorios toxicológicos encargados de realizar análisis de identificación de los metabolitos correspondientes a Benzoilecgonina (Cocaína) y 11-hidroxi-delta-9-THC (Marihuana) presentes en el fluido biológico (orina), un tipo de almacenamiento de dichas muestras, ya que no existe un acuerdo generalizado en dichos laboratorios para su almacenamiento y se desconoce el tiempo en el que permanecen los metabolitos en los fluidos analizados; de esta forma, en caso de que sea solicitado un reanálisis de las muestras previamente analizadas, los laboratorios tendrán una herramienta para poderse auxiliar en sus trabajos y en caso de ser necesario poderse amparar ante cualquier eventualidad, ya que sus resultados serán más confiables apoyándose en este proyecto.

Uno de los principales objetivos de este trabajo es presentar y analizar información científica sobre lo encontrado en un estudio de estabilidad con una duración de seis meses, en los cuales se analizaron dos factores (temperatura y tiempo de almacenamiento) a un grupo de muestras positivas a los metabolitos de las drogas cocaína y marihuana, durante dicho periodo se evaluó el efecto que tienen los factores antes mencionados y de esta forma poder determinar el grado en que afectan la estabilidad de las muestras biológicas; en este sentido, también puede ser de gran utilidad para guiar, reforzar y promover la elaboración de investigaciones enfocadas hacia aspectos específicos.

1. ANTECEDENTES

1.1. ESTABILIDAD

1.1.1. DEFINICIÓN

La estabilidad es la capacidad de un fármaco o un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil.¹

La estabilidad de un fármaco presente en un fluido biológico está en función de las condiciones de almacenamiento de la muestra, las características químicas de la droga, la matriz y el sistema (envase) que lo contenga.

Si los incrementos o las disminuciones fluctúan más de veinte por ciento de la concentración original, las drogas analizadas ya no son consideradas científicamente válidas. Cuando esto ocurre, el tiempo de almacenamiento usado es convertido en la llave para monitorear, manipular y mantener fluctuaciones bajo la desviación de veinte por ciento.

El conocimiento de la estabilidad *in vivo* e *in vitro* de drogas en especímenes biológicos, con el paso del tiempo son críticos para la validez y la interpretación de concentraciones de droga obtenidas a partir de especímenes médico-legales.

Es importante mencionar que la estabilidad de una droga en una matriz particular y en un sistema-contenedor específico, tiene importancia sólo para esa matriz y ese sistema de envase y no deberá ser extrapolado para otras matrices y/u otros sistemas de envase.

1.1.2. TIPOS DE ESTABILIDAD²

La estabilidad es definida como la extensión para la cual un producto mantiene, dentro de límites especificados, y a todo lo largo de su período de almacenamiento las mismas propiedades y características que mantuvo al momento de su manufactura. Existen cinco tipos de estabilidad generalmente reconocidas, las cuales se mencionan en la tabla 1.1.

1.1. Criterios de aceptabilidad para la estabilidad

LAS CONDICIONES QUE DEBEN MANTENERSE PARA SER CONSIDERADAS ESTABLES	
TIPOS DE ESTABILIDAD	
QUÍMICA	Cada ingrediente activo retiene la integridad química y su potencia designada dentro de los límites específicos.
FÍSICA	Las propiedades físicas originales, la apariencia e inclusive el buen sabor, la uniformidad y la disolución deben ser mantenidas.
MICROBIOLOGÍA	La resistencia o esterilidad microbiológica para el crecimiento microbiano es mantenida según los requisitos especificados. Los agentes antimicrobianos que estén presentes retienen la efectividad dentro de los límites microbianos.
TERAPÉUTICA	El efecto terapéutico permanece inalterado.
TOXICOLÓGICA	Ningún incremento significativo ocurre en la toxicidad.

Cada ingrediente, ya sea terapéutico ó farmacéutico, puede afectar la estabilidad de las drogas. Los factores ambientales que pueden reducir la estabilidad incluyen exposición a las temperaturas extremas, la luz, la humedad, el oxígeno, y el dióxido de carbono.

Lo que influye en la estabilidad de una sustancia especialmente a emulsiones y suspensiones son principalmente el pH, la composición del diluyente del sistema, la compatibilidad de aniones y cationes, la fuerza iónica presente en la disolución, el envase primario, los aditivos químicos específicos y la difusión molecular de drogas y excipientes.

1.1.3. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD^{1,2}

La estabilidad de las muestras biológicas debe ser demostrada por el laboratorio clínico, utilizando métodos apropiados para ese fin. Las consideraciones de estabilidad deben incluir no sólo los requisitos en concentración específicos, sino también los cambios en la apariencia física del producto que advertirían a los analistas si la integridad continuada de la muestra es cuestionable.

Se pueden definir como aquellas pruebas o ensayos que se le realizan a un medicamento o muestra para determinar cómo se modifican las características físicas y químicas bajo la influencia de diversos factores ambientales como son temperatura, humedad y luz, con el objeto de determinar el periodo útil y las condiciones de almacenamiento en que sus características permanecen dentro de los límites especificados.

Los estudios de estabilidad acelerada están diseñados bajo condiciones exageradas de almacenamiento para incrementar la velocidad de degradación química, biológica o los cambios físicos de un fármaco o de un medicamento.

En estos casos se aplican los principios de la cinética química, teniendo como premisa que la velocidad de reacción aumenta con la temperatura.

Para ello, se colocan las muestras en cámaras a diferentes temperaturas y se van realizando valoraciones en el tiempo hasta alcanzar una concentración del producto final cercana al 50 % (la cual puede ser menor dependiendo del tiempo necesario para alcanzarlo o de otros factores) y se obtienen una serie de datos de concentración contra el tiempo.

Generalmente, los procesos de degradación son reacciones químicas que consumen energía y que pueden acelerarse por aumento de temperatura. La mayoría de los métodos de envejecimiento acelerado toman en cuenta este hecho y se basan en mediciones de la velocidad de degradación a temperaturas superiores o inferiores a la normal, para luego obtener inferencias de lo que sucederá a temperatura ambiente.

Los estudios de estabilidad a largo plazo son aquellos diseñados bajo condiciones de almacenamiento controladas para evaluar las características físicas, químicas, biológicas o microbiológicas del fármaco o medicamento durante el periodo de re análisis o de caducidad, respectivamente.

Un programa anual de estabilidad es un estudio diseñado para verificar la estabilidad del fármaco o medicamento a partir de lotes de producción, bajo condiciones de estabilidad a largo plazo.

Cinética Química En Los Estudios De Estabilidad

La mayoría de los métodos de envejecimiento acelerado toman en cuenta que, generalmente, los procesos de degradación son reacciones químicas que consumen energía y que pueden acelerarse por medio de la temperatura, y se basan en mediciones de la velocidad de degradación a temperaturas superiores o inferiores a la normal, para posteriormente sacar inferencias de lo que sucedería a temperatura ambiente. Están basados en principios fisicoquímicos y por ello se hace necesario tener conocimientos básicos de la cinética química a fin de poder interpretar los resultados.

Todos los métodos aplicables a la predicción de un periodo de caducidad tienen una base fisicoquímica, ya que la degradación comprende uno o más reacciones cuya velocidad puede calcularse cinéticamente. La cinética química es la disciplina a la que le concierne el mecanismo por el cual un proceso químico alcanza su estado final desde el estado inicial y a la velocidad con la que esta reacción se produce. Así mismo, la cinética química involucra el estudio de la velocidad de los cambios químicos y la forma en que esa velocidad es influida por las condiciones de concentración de los reactantes, los productos y otras especies químicas que pudieran estar presentes y por factores como el disolvente, la presión y la temperatura.³

A partir de estos estudios, uno o más mecanismos que involucran una serie de procesos elementales pueden postularse para explicar cómo los reactantes se convierten en productos durante un proceso químico. Aplicada a las muestras biológicas, esta información permite un enfoque racional de la estabilización de muestras de drogas y la predicción de la vida útil y las condiciones óptimas de conservación.

Cinética. Se emplea para describir el estudio cuantitativo del cambio en la concentración, presión o en alguna propiedad que relacione con la composición del sistema, provocada por una reacción química en función del tiempo.

Velocidad de reacción. Es la velocidad con la cuál cambia la concentración de una sustancia que interviene en esa reacción. La sustancia en cuestión puede ser un reactivo o un producto de la reacción. Se entiende por reactivo toda aquella sustancia de la cual se parte, (estado inicial **EI**) mientras que producto es aquella sustancia que se forma, Estado final (**EF**).^{3,4}

Se refiere a la velocidad con que un sistema reaccionante se acerca a un estado de equilibrio, en el que existe la masa de producto formado en un tiempo dado bajo condiciones establecidas.

Las concentraciones dentro de la cinética química se expresan comúnmente en moles por litro (mol/L) y el tiempo se expresa en segundos.

Tal definición se puede representar matemáticamente por la siguiente ecuación:

$$V = \frac{-d[A]}{Dt} \quad 1.1$$

En la que V = velocidad, dA es el cambio que ocurre en la propiedad de un componente A, en este caso la concentración del reactivo A, en un intervalo de tiempo dt , el signo negativo se refiere a que la concentración del reactivo disminuye al aumentar el tiempo.

En la reacción $A + B \longrightarrow C$. A y B son reactivos y C es el producto. La velocidad de reacción puede definirse como la velocidad de desaparición de A, como disminuye la concentración de A a medida que transcurre el tiempo, lo que matemáticamente está representado por $-d[A]/dt$, la velocidad de desaparición de B o la velocidad de aparición de C:

$$V = \frac{-d[A]}{Dt} = \frac{-d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} \quad 1.2$$

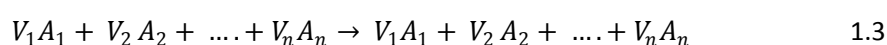
La concentración de determinada sustancia suele relacionarse proporcionalmente con alguna propiedad de fácil medición, como presión, adsorción de radiación, rotación óptica, etc. y entonces la velocidad de la reacción es susceptible de medirse por el aumento o disminución de la presión (cuando se forman o consumen gases), de la absorción de luz (cuando se producen o se descomponen productos coloreados), de la rotación óptica (cuando se forman o se consumen compuestos ópticamente activos), etc.

Las reacciones químicas rara vez transcurren en una sola etapa tal como se suele designar. En una expresión común de una sola etapa, las reacciones químicas presentan solamente los estados inicial y final. Esta designación se puede considerar como la expresión del balance de materia (ley de la conservación de la materia). En realidad la reacción se desarrolla a través de una serie de etapas intermedias. En la mayoría de los casos no se conoce el mecanismo detallado del desarrollo de la reacción, debido a las grandes dificultades que surgen al tratar de revelar los productos intermedios que se forman en el curso de la misma.

Constante de Velocidad^{3,4}. Mide la velocidad de una reacción química dada en condiciones específicas. Se le puede definir como la rapidez del cambio de la concentración de reactivo a producto para una reacción en la cual todos los reactivos se hallan a una concentración unitaria. La definición anterior no puede utilizarse siempre en forma cuantitativa debido a que:

- a) En general, las reacciones químicas no suelen efectuarse con todos los reactivos a una concentración de un mol por litro, de hecho, muchos reactivos no alcanzan semejante solubilidad.
- b) Aún si el sistema estuviera inicialmente a una concentración unitaria, tan pronto se produjera la reacción, la concentración se alteraría y se modificaría la velocidad de reacción.
- c) La presión, fuerza iónica, etc., que en dicha reacción se suponen constantes afectan ligeramente a la constante de velocidad.

Cabe mencionar que a temperatura constante, la velocidad de reacción química es directamente proporcional a las concentraciones de los reactivos, tal como la siguiente reacción:



Expresando velocidad de reacción como una constante (factor de proporcionalidad), multiplicada por una función de las concentraciones de reactivos elevados a una potencia. O bien,

$$\frac{d[A]}{dt} = kf[C_{A_1}^{n_1} C_{A_2}^{n_2} \dots C_{A_n}^{n_n}] \quad 1.4$$

Donde:

$C_{A_1}^{n_1}$ = Corresponde a las concentraciones de los reactivos.

k = Es la constante de la velocidad de la reacción.

n_1 = Corresponde al orden de reacción por la sustancia dada.

Esta función sólo involucra a las concentraciones de las sustancias reaccionantes cada una elevada a una determinada potencia, que equivale a la unidad cuando todos los reactivos poseen una concentración unitaria. Por lo tanto, en estas condiciones $d[A_1]/dt = k$; que equivale a la constante de velocidad.

Para cualquier reacción en particular, el valor de k es constante a una temperatura y presión dadas, y resulta una medida cuantitativa conveniente de reactividad química. Sin embargo, debe insistirse en Cabe mencionar que k aumenta rápidamente con la temperatura y, en consecuencia, las ecuaciones como la ecuación 1.3 sólo son válidas cuando la temperatura se mantiene constante.

Ley de Velocidad^{3,4} En las reacciones sencillas, la ley de velocidad adopta una de las formas que se muestran en la tabla 1.2., las cuales son ecuaciones diferenciales y conocidas como la forma diferencial de la ley de velocidad. En las reacciones complejas, la ley de velocidad suele adoptar una forma más complicada, pudiendo aparecer exponentes fraccionarios.

Tabla 1.2. Funciones diferenciales de la ley de velocidad.

LEY DE VELOCIDA	ORDEN DE REACCIÓN
$\frac{d[A_1]}{dt} = k(A)^0 = k$	0
$\frac{d[A_1]}{dt} = kA$	1
$\frac{d[A_1]}{dt} = k(A)^2$	2
$\frac{d[A_1]}{dt} = k((A))(B)$	2

$\frac{d[A_1]}{dt} = k(A)(B)^2$	3
$\frac{d[A_1]}{dt} = k(A)(B)(C)$	3

El hecho de establecer la ley de velocidad cumple tres propósitos:

1. Permite la predicción de la velocidad dada la composición de la mezcla y el valor experimental de la constante de velocidad.
2. La explicación de la ley de velocidad involucra el establecer un mecanismo de reacción, y un mecanismo aceptable debe estar de acuerdo con la ley de velocidad observada.
3. Permite clasificar las reacciones en varios "ordenes". El orden de una reacción es la potencia a la cual se eleva la concentración de un componente en la ley de velocidad, y el orden global es la suma de las potencias de las concentraciones.

Para que una reacción tenga lugar, es preciso que se produzca un choque, una colisión entre las moléculas que intervienen en esa reacción. Si, por cualquier medio las moléculas A y B se mantienen a cierta distancia, separadas entre sí, no existe ninguna posibilidad de reacción entre ambas.

Ordenes de Reacción³

Reacción de orden cero. En una reacción de orden cero, la velocidad de reacción (V) es independiente de la concentración de los reactivos, pero no de otros tales como la cantidad de luz absorbida en ciertas reacciones fotoquímicas o la cantidad de catalizador en reacciones catalíticas. La ecuación matemática que expresa esa independencia es $V=k$, o, según la definición de velocidad que se dio antes para la reacción:

$$A + B \rightarrow C$$

$$V = \frac{-d[A]}{dt} = \frac{-d[B]}{dt} = \frac{-d[C]}{dt} = k \quad 1.5$$

Si llamamos C_0 a la concentración inicial de sustancia activa, puede abreviarse diciendo que la velocidad de disminución de C_0 es independiente de ésta, o sea, constante

$$\frac{-d[C_0]}{dt} = k \quad 1.6$$

$$-d[C_0] = k \cdot dt \quad 1.7$$

$$C = C_0 - kt \quad 1.8$$

$$k = \frac{(C_0 - C)}{t} \quad 1.9$$

La representación de la concentración en función del tiempo, en una reacción de *orden cero*, es una recta cuya pendiente es la constante de velocidad de reacción (-k) cuyas dimensiones son mol por litro⁻¹ seg⁻¹, y la ordenada al origen, la concentración inicial (C_0). Cabe destacar que ésta va

a ser siempre una recta de pendiente negativa (-k) de modo que la constante de velocidad de reacción (k) será invariablemente positiva.

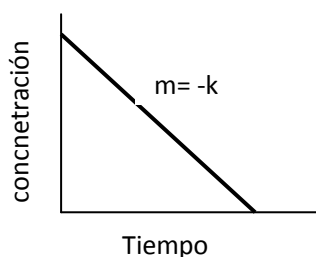


Fig. 1 Expresión Grafica para reacciones de orden cero

Reacción de Primer Orden. En una reacción de primer orden, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de uno de sus reactivos. Según la reacción $A + B \rightarrow C$, la reacción puede ser primer orden con respecto a A:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k[A] \quad 1.10$$

O de primer orden con respecto a B:

$$\frac{-d[B]}{dt} = k[B] \quad 1.11$$

En forma más general, la expresión de velocidad de una reacción de primer orden sería:

$$\frac{-d[C]}{dt} = k \cdot C \quad 1.12$$

Donde C es la concentración. Integrando la ecuación anterior se obtiene:

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad 1.13$$

Que también puede expresarse como:

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt \quad 1.14$$

$$C = C_0 e^{-kt} \quad 1.15$$

La representación del logaritmo natural de la concentración actual en función del tiempo es una recta de pendiente igual a -k.

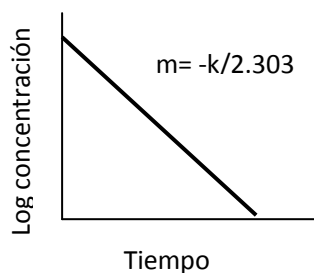


Fig. 2 Expresión gráfica para reacciones de primer orden.

Reacciones de Segundo Orden. En una reacción de segundo orden, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de dos reactivos o a la segunda potencia de uno de ellos.

$$V = k[A] \cdot [B] \quad 1.16$$

En el caso más simple en que las concentraciones de A y B son iguales, $[A] = [B]$

$$V = k [A]^2 \quad 1.17$$

$$\frac{-dC}{dt} = k \cdot C^2 \quad 1.18$$

Integrando la ecuación (1.18), entre los límites C_0 y C_1 se obtiene:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt \quad 1.19$$

La representación gráfica de la inversa de la concentración en función del tiempo es una recta de pendiente $-k$ y ordenada al origen $1/C_0$.

También es el caso cuando la velocidad de reacción depende de la segunda potencia de la concentración de uno de los reactivos.

$$V = k[A]^2 \quad 1.20$$

El tratamiento es el mismo, obteniéndose la ecuación (1.19). El orden de la reacción puede controlarse calculando k para distintos valores de C y t :

$$k = \left(\frac{1}{t}\right) \left(\frac{1}{C} - \frac{1}{C_0}\right) \quad 1.21$$

La constancia de los k obtenidos confirmará una reacción de segundo orden. Si las concentraciones de A y B no son iguales y llamamos a y b a las concentraciones iniciales de **A** y **B**,

respectivamente, y x representa la concentración de C, la velocidad de reacción será proporcional a la concentración actual de A y de B.

$$V = \frac{dx}{dt} = k(a-x)(b-x) \quad 1.22$$

La forma integrada de esta ecuación es:

$$\frac{1}{(b-a)} \ln \frac{a(b-x)}{b(a-x)} = kt \quad 1.23$$

$$\frac{1}{(a-b)} \ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)} = kt \quad 1.24$$

En estos casos se calcula k numéricamente para valores de (a,b) y t, y se observa su constante.

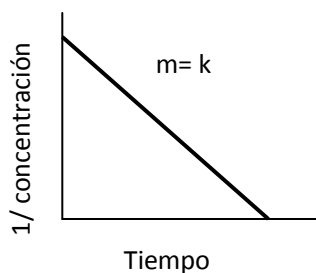


Fig.3 Expresión gráfica para reacciones de segundo orden

Reacciones de pseudo-primer orden. Una reacción puede ser de pseudo-primer orden si, siendo de segundo orden, la concentración de uno de los reactivos es muy elevada. Si uno de los reactivos es el agua y está presente en exceso, su concentración permanece prácticamente sin cambio y además debe considerarse que tiene un valor constante durante la reacción. Casi todas las reacciones de solvolisis y de oxidación son de este tipo.

$$V = k[A] \cdot [H_2O]$$

$$\frac{dx}{dt} = k(a-x) \cdot (b-x) \quad 1.25$$

Como x es muy pequeño respecto b , puede escribirse:

$$\frac{dx}{dt} = k(a-x) \cdot b = k^1(a-x) \quad 1.26$$

Y la velocidad de reacción depende solo de la concentración actual de A.

Reacciones de orden cero aparente. También una reacción puede ser de orden cero aparente, si siendo de primer orden, transcurre en solución saturada:

$$\frac{dx}{dt} = kx = kC_s = k^1 \quad 1.27$$

Donde C_s representa la solubilidad de la sustancia.

Las muestras biológicas pueden ser un ejemplo de este tipo de cinética, en la cual la concentración en solución depende de la solubilidad del fármaco. Como el fármaco se descompone en solución, se libera más sustancia activa a raíz de las partículas suspendidas, así que la concentración es la solubilidad del fármaco, en un solvente particular y a una temperatura dada.

La ecuación para una solución ordinaria, sin reservorio del fármaco que reemplace el agotado, es de primer orden:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k[A] \quad 1.28$$

Donde A es la concentración del fármaco que permanece sin descomponerse a un tiempo t, y k es la constante de velocidad de primer orden. Cuando la concentración de A([A]) permanece constante:

$$k[A] = k_0 \quad 1.29$$

Así que la ley de velocidad de primer orden se convierte en:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k_0 \quad 1.30$$

Una ecuación que es de orden cero es denominada ecuación de orden cero aparente. Esto es porque el reservorio de fármaco suspendido asegura una concentración constante. Una vez que todas las partículas suspendidas han sido convertidas a fármaco en solución, el sistema cambia a una reacción de primer orden.

Es necesario que en las experiencias cinéticas las reacciones se sigan hasta un porcentaje avanzado de degradación (50% como mínimo), pues de lo contrario se obtendrán valores de la velocidad de reacción muy poco precisos y generalmente mayores que el valor real. Además, es prácticamente imposible decidir el orden de reacción cuando esta sólo ha avanzado 10 ó 20%.

Reacciones complejas. Muchas reacciones no pueden ser expresadas por ecuaciones de primer, segundo o tercer orden. Ellas involucran más de un paso o reacción elemental y son conocidas como reacciones complejas. Sin embargo, las reacciones que se efectúan en pasos múltiples pueden comportarse igualmente que las de cero, primero, segundo o tercer orden.

Dentro de este tipo de reacciones se encuentran las reacciones reversibles, paralelas y consecutivas.

En condiciones particulares, las reacciones complejas aparecen a menudo como si fueran de cero, primer, segundo o tercer orden, porque el paso que determina la velocidad la velocidad permanece a alguna de estas clasificaciones, y los otros pasos son muy rápidos.

La reacción reversible más simple es en la cual la reacción directa (k_1) y la reacción inversa (k_2) son procesos de primer orden:



Esta ecuación parece ser un equilibrio entre A y B, pero debe señalarse que esta situación requiere que las concentraciones de A y B no cambien con el tiempo. Debido a que esta expresión intenta describir un proceso cinético, debe comprenderse que la ecuación describe la aproximación al equilibrio. Así pues, se representa que A disminuye para formar B y algo del producto B se revierte a A. De acuerdo a esta descripción, la velocidad neta a la cual A disminuye estará dada por la velocidad a la cual A disminuye para formar B menos la velocidad a la cual A aumenta.

$$\frac{-d[A]}{dt} = k_1A - k_2B \quad 1.32$$

Esta ley de velocidad puede integrarse notando que:

$$A_0 - A = B \quad 1.33$$

Substituyendo la ecuación 1.33 en 1.32 e integrando tenemos:

$$\ln \left[\frac{k_1 A_0}{(k_1 + k_2) A - k_2 A_0} \right] = (k_1 + k_2) \cdot t \quad 1.34$$

La ecuación (1.34) puede simplificarse introduciendo una condición de equilibrio.

$$k_1 A_{eq} = k_2 B_{eq} \quad 1.35$$

La ecuación 1.35 puede utilizarse para resolver la concentración en equilibrio en términos de la concentración inicial.

La ecuación corresponde a una línea recta que tiene un intercepto de valor cero y una pendiente de $(k_1 + k_2)/2.303$, como se muestra en la figura 4.

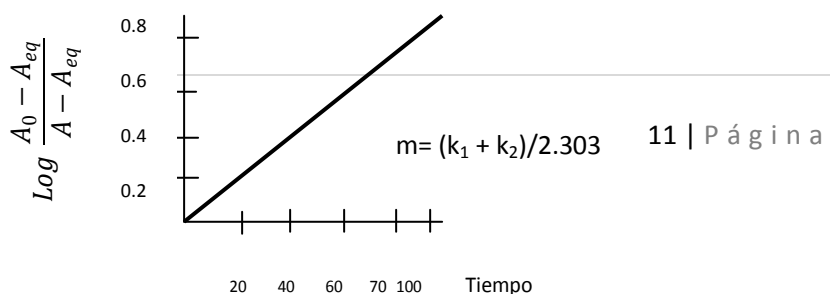


Fig. 4 Representación gráfica para una reacción reversible

Debido a que la constante de equilibrio de la reacción está dada por:

$$k = \frac{k_1}{k_2} = \frac{B_{eq}}{A_{eq}} = \frac{A_0 - A_{eq}}{A_{eq}} \quad 1.36$$

Ambas constantes de velocidad pueden obtenerse una vez que la pendiente de la línea y la constante de equilibrio han sido determinadas.

*Métodos para determinar el orden de reacción.*³ Puede utilizarse cualquier procedimiento analítico, sea químico, físico o microbiológico, que permita determinar específica y cuantitativamente la concentración de uno de los reactivos.

1. *Método de sustitución.* Los datos de los estudios de degradación de los fármacos pueden ser sustituidos en las fórmulas integradas de las ecuaciones para los diferentes órdenes de reacción. Si los valores de k son constantes, dentro de los límites de error experimental. La ecuación elegida indica el orden de reacción bajo investigación. Si los datos no se ajustan a cualquiera de estas ecuaciones, la ley de velocidad de reacción es más complicada.
2. *Método gráfico.* Se presupone que la velocidad de degradación es sólo función de la concentración del fármaco degradable y se determina en relación con el tiempo. Luego se representan las tres funciones de concentración de A con base en el tiempo, cada una de las cuales corresponde, respectivamente, a una reacción de orden cero (si se representa C vs t), de primer orden (log C vs t) o de segundo orden (1/C vs t). La función que asemeje la curva lineal, es decir, la que más se aproxime a una recta, decidirá el orden de la reacción.

En la figura 5 puede apreciarse lo que ocurre cuando los datos de concentración se representan en tres formas distintas en función del tiempo: concentración (reacción de orden cero), logaritmo de la concentración (reacción de primer orden) e inversa de la concentración (reacción de segundo orden).

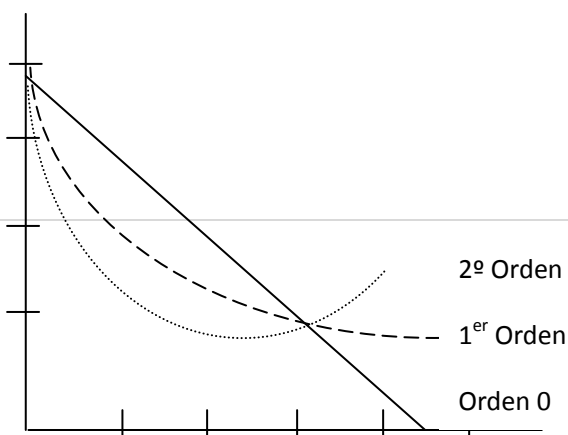


Fig. 5 Representación gráfica de la concentración en función del tiempo para reacción de orden cero.

3. *Método de vida media.* En una reacción de orden cero, la vida media es proporcional a la concentración inicial C_0 (a), como se observa en la tabla 1.3, la vida media de una reacción de primer orden es independiente de a ; el tiempo de vida media para una reacción de segundo orden, en la cual $a=b$, es proporcional a $1/a$. La relación entre estos resultados muestra que, en general, la vida media de una reacción, en la cual las concentraciones de todos los reactivos son idénticas es:

$$t_{1/2} \propto \frac{1}{(a)^{n-1}} \quad 1.37$$

En la cual, n es el orden de la reacción. Así, si dos reacciones ocurren a concentraciones iniciales diferentes, a_1 y a_2 , las vidas medias $t_{1/2(1)}$, se relacionan como sigue:

$$\frac{t_{1/2(1)}}{t_{1/2(2)}} = \frac{(a_2)^{n-1}}{(a_1)^{n-1}} = \left(\frac{a_2}{a_1}\right)^{n-1} \quad 1.38$$

Y finalmente:

$$n = \left[\frac{\log\left(\frac{t_{1/2(1)}}{t_{1/2(2)}}\right)}{\log\left(\frac{a_2}{a_1}\right)} \right] + 1 \quad 1.39$$

Las vidas medias se obtienen gráficamente a partir de las gráficas trazadas con a vs t , para dos concentraciones iniciales distintas. Estos valores se sustituyen en la ecuación (1.3.) y así se obtiene directamente el orden de reacción, como se representa en la tabla 1.3.

Tabla 1.3. Ecuaciones para determinar el $t_{1/2}$ y $t_{90\%}$ para cada orden de reacción.

ORDEN DE REACCIÓN	ECUACIÓN INTEGRADA	ECUACIÓN PARA $t_{1/2}$	ECUACIÓN PARA $t_{90\%}$
0	$C - C_0 = -kt$	$t_{1/2} = \frac{C_0}{2k}$	$t_{90\%} = \frac{0.1C_0}{k}$

1	$\ln \frac{C_0}{C} = kt$	$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$	$t_{90\%} = \frac{0.106}{k}$
2	$\frac{1}{C} - \frac{1}{C_0} = kt$	$t_{1/2} = \frac{1}{kC_0}$	$t_{90\%} = \frac{1}{9kC_0}$

Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción.

Energía de activación. La velocidad de una reacción depende de dos factores, un factor de frecuencia y otro de energía de activación. El factor pre exponencial representa la frecuencia de las colisiones entre las moléculas químicas. Entre mayor sea el numero de colisiones la reacción es más rápida, de igual manera las reacciones más rápidas son aquellas en las que E_a es menor a 0,100 cal/mol.^{3,4}

Para una reacción que ocurre a una velocidad que se puede medir, solamente una pequeña fracción de todas las moléculas posee la energía necesaria para sufrir una reacción química. La diferencia entre la energía necesaria para reaccionar y la energía promedio de las moléculas, se llama energía de activación (E_a).

Se espera que las velocidades de reacción sean proporcionales al número de colisiones por unidad de tiempo; aunque la cantidad de colisiones es mayor conforme se incrementa la temperatura. En general, al aumentar la temperatura se eleva a su vez la constante de velocidad de la reacción, tal observación fue hecha por Arrhenius, al postular que las moléculas químicas normales no participan en las reacciones químicas, sólo lo hacen aquellas que han adquirido un valor energético superior, a determinado valor crítico (energía de activación). La ecuación empírica que representa esta relación es:

$$k = Ae^{\frac{E_a}{kT}} \quad 1.40$$

Donde:

- k= Constante de velocidad de reacción de cualquier orden
- A= Constante preexponencial o factor de frecuencia
- R= Constante de los gases (1.987 cal/grado mol)
- T= Temperatura absoluta °K (temperatura en °C + 273.15 °C)
- E_a =Energía de activación de la reacción química.

La ecuación de Arrhenius puede ser descrita en varias formas equivalentes, tales como:

$$\text{Log } k = \text{Log } A - \left(\frac{E_a}{2.303R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) \quad 1.41$$

$$\ln k = \ln A - \left(\frac{E_a}{R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) \quad 1.42$$

A continuación se muestra la tabla 1.4 con las energías de activación para diferentes tipos de reacciones.

Tabla 1.4. Energías de activación para diferentes tipos de reacciones

TIPO DE REACCIÓN	Ea (Kcal/mol)
Pirólisis	50-70
Transformación polimórfica en fase sólida	56
Deshidratación	33
Solvólisis	10-30
Oxidación	8-12
Fotólisis	2-3

De una manera objetiva, en la figura 6, se demuestra lo que pasa para que una reacción exotérmica se lleve a cabo. Las moléculas con baja energía (reaccionantes) necesitan activarse, es decir, aumentar su energía (lo cual puede ser por incremento de temperatura) para hacer posible que se produzca la reacción, con una disminución total de energía (ΔH) y con una disminución notoriamente mayor si la consideramos desde el estado activado, pero lo que en el proceso realmente se ve, es el cambio total del sistema, o sea ΔH .

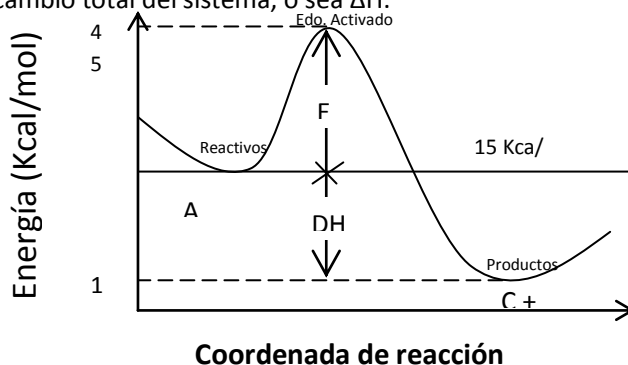


Fig. 6 Gráfica de la energía de activación para una reacción exotérmica Métodos Para Predecir La Estabilidad.³

La estabilidad puede ser predicha con la ayuda de las ecuaciones cinéticas descritas anteriormente. Estas ecuaciones posibilitan el cálculo de la velocidad y grado de la descomposición mediante la sustitución de valores adecuados para temperatura, concentración inicial, presión, tiempo, pH, contenido de oxígeno, intensidad de luz, etc. Así, la estabilidad puede ser determinada por la velocidad a la cual ocurre la descomposición.

Método empírico. Este procedimiento establece que por cada 10°C de aumento de la temperatura se duplica el valor de la velocidad de reacción.

Método del coeficiente de temperatura (Q_{10}). La regla Q establece que la velocidad de degradación de un producto disminuye por un factor constante Q_{10} cuando la temperatura de almacenamiento disminuye 10°C.

El coeficiente de temperatura Q_{10} , se define como el coeficiente entre la velocidad de reacción a cierta temperatura y la velocidad de reacción a una temperatura 10°C inferior. Por cálculos sucesivos se puede llegar a obtener la velocidad de reacción a la temperatura deseada y, en consecuencia, el $t_{90\%}$ a 25°C.

El método Q_{10} para estimar la vida de utilidad proporciona al analista una herramienta para calcular una fecha de uso posterior para una muestra que será almacenada o empleada bajo diferentes condiciones.

El método Q_{10} , basado en la energía de activación, es independiente del orden de reacción y se describe como:

$$Q_{10} = e^{\left[\left(\frac{E_a}{R}\right)\left(\frac{1}{T+10}\right)\left(\frac{1}{T}\right)\right]} \quad 1.43$$

Donde E_a es la energía de activación, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta. En realidad, la expresión Q_{10} es simplemente una razón de dos constantes de velocidad de reacción diferente, definida como sigue: k_1 es la constante de velocidad de reacción a una temperatura específica, T y $K_{(T+10)}$ es la constante de velocidad de reacción a una temperatura 10°C más alta. Los valores de "Q" que son dados comúnmente son 2,3 y 4 y se relacionan con diferentes energías de activación, 12.2, 19.4 y 24.5 Kcal/mol, respectivamente.

$$t_{90}(T_2) = \frac{t_{90}(T_1)}{Q_{10}\left(\frac{\Delta T}{10}\right)} \quad 1.44$$

La ecuación anterior donde $t_{90}(T_2)$ es la vida de de utilidad estimada, $t_{90}(T_1)$ es la vida de utilidad a una temperatura dada T_1 y ΔT es la diferencia de temperatura entre T_1 y T_2 .

$$Q_{10} = \frac{K_{(T+10)}}{K_T} \approx 3 \quad 1.45$$

(Valor típico, $E_a=20$ Kcal/mol)

La constante de velocidad exponencial con la temperatura, y es proporcional a $(Q_{10})^n$, donde n es el cambio de temperatura ($^\circ\text{C}$) dividido entre 10. Este modelo asume falsamente que el valor de Q no varía con la temperatura.

El fundamento del método supone que el coeficiente de temperatura es constante en un amplio rango, pero actualmente se sabe que no es así y disminuye al aumentar la temperatura, razón por la cual obtienen generalmente valores de vida media inferiores al dato real: tanto mas inferiores cuanto más alejadas sean las temperaturas experimentales de la del ambiente. Es un método sujeto a errores considerables y no puede recomendarse su uso, si se consideran los datos más acertados que se logran por otros métodos.

Método de Arrhenius. La ecuación de Arrhenius proporciona las bases que permiten la predicción de la estabilidad por extrapolación de los datos de velocidad obtenidos a temperaturas diferentes.

Para la aplicación correcta del método de Arrhenius deben tomarse en cuenta algunas consideraciones:

- a) Seguridad sobre el orden de reacción. Para ello es necesario que la reacción haya avanzado lo suficiente, ya que el primer 10% de la reacción es muy difícil distinguir un orden de otro.

- b) Exactitud en la medición de las temperaturas. Esto es tanto más necesario cuanto menor sea la diferencia entre una y otra. Como máximo se podrá admitir una discrepancia de $\pm 0.5^\circ\text{C}$. El error en la medición del tiempo es menos común, ya que generalmente se tratan de valores altos y no es fácil equivocarse en más o menos un día.

Grafica de Arrhenius. La ecuación 1.44 se utiliza para realizar una gráfica de $\log K$ contra $1/T$ obteniéndose una línea con una pendiente de $-E_a/2.303R$. Este tipo de grafica es llamada gráfica de Arrhenius. La energía de activación se puede determinar a partir de dicha grafica.

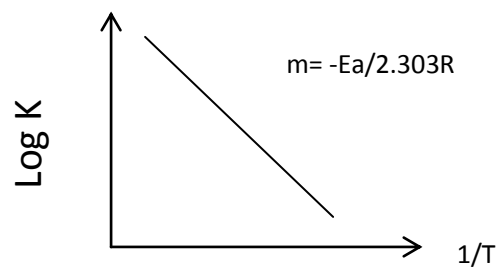


Fig. 7 Grafica de Arrhenius

De la pendiente se puede conocer la energía de activación (E_a), parámetro cinético importante pues con él se puede tener una idea de la facilidad con que produce la reacción química y esto puede dar un panorama de la estabilidad. A medida que el valor de energía de activación aumenta, la reacción de degradación necesita más energía para vencer la barrera energética y esto hace que sea más lenta y más difícil de producirse a las condiciones ambientales a las que se almacena la muestra.

Otra manera de calcular la energía de activación consiste en determinar los valores de las constantes de velocidad (k_1 y k_2) a dos diferentes temperaturas (T_1 y T_2), de acuerdo a las ecuaciones siguientes:

$$\log k = \text{Log } A - \left(\frac{E_a}{2.303R} \right) \left(\frac{1}{T} \right) \quad 1.45$$

$$\log k_1 = \text{Log } A - \left(\frac{E_a}{2.303R} \right) \left(\frac{1}{T_1} \right) \quad 1.46$$

También,

$$\log k_2 = \text{Log } A - \left(\frac{E_a}{2.303R} \right) \left(\frac{1}{T_2} \right) \quad 1.47$$

Después de la resta de las ecuaciones (1.46) y (1.47)

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \left(\frac{Ea}{2.303R} \right) \left[\frac{(T_2 - T_1)}{T_2 T_1} \right] \quad 1.48$$

Si k_1 y k_2 son conocidas, el valor de la energía de activación (Ea) puede ser calculado.

Si se conoce A y Ea se puede calcular la velocidad de reacción a la temperatura que se desee. Es importante señalar que para muchas reacciones la energía de activación está tabulada, de modo que, determinando la constante de velocidad de la reacción a una temperatura y conociendo la Ea se puede calcular el valor de la constante A y con este dato recalcularse el valor de la constante de velocidad de reacción a otra temperatura.

Ventajas y limitaciones de la ecuación de Arrhenius. El método más satisfactorio para expresar la influencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción es la relación cuantitativa expresada por Arrhenius.

La aplicación de la ecuación de Arrhenius constituye un paso fundamental en la determinación de la fecha de vencimiento, ya que mediante ella se puede determinar la constante de velocidad a la temperatura de almacenamiento.

Por el empleo de esta ecuación puede verse limitado en ciertos casos. El más común se presenta cuando se aplican indiscriminadamente rangos de temperatura a determinados sistemas, en los cuales se puede exceder la energía de activación para reacciones que ocurren en el rango de temperaturas que incluyen la ambiental con lo que cabe la posibilidad de que se produzcan mecanismos muy diferentes a los que gobiernan el curso de una reacción a temperaturas bajas.

Otra desviación que puede presentarse para esta ecuación es el caso de las reacciones de cadena. Este mecanismo, se encuentra en las reacciones de tipo fotoquímico y de oxidación, en las que por ser reacciones que proceden en su mayoría por radicales libres, son reacciones en cadena.

1.1.4. FACTORES QUE INFLUYEN^{2,4,5}

Las causas que condicionan la estabilidad de los muestras son de dos tipos. Por una parte, está la labilidad propia de los metabolitos y de la matriz que viene condicionada en último término por su estructura y propiedades químicas y fisicoquímicas. Por otra parte, están los factores externos, como temperatura, humedad, aire y luz, que inducen o aceleran reacciones que devalúan la claridad o la actividad del metabolito.

De lo anterior se desprenden:

Factores ambientales

- Calor
- Humedad
- Luz
- Oxígeno

Otras condiciones físicas (por ejemplo, vibraciones o congelación)

Factores relacionados con el metabolito. Las propiedades químicas y físicas del metabolito y de los elementos auxiliares (como la matriz) utilizados (por ejemplo, la presencia de ciertas impurezas, la forma particular polimórfica o cristalina, el tamaño de las partículas y la presencia de agua).

El metabolito y su composición

La naturaleza del contenedor o de los envases con los que el producto puede entrar en contacto directo o que de cualquier otra forma puede influir sobre la estabilidad.

1.1.4.1. Factores ambientales⁵

Los factores ambientales (calor, luz, humedad) pueden influir en la estabilidad de los fármacos y de los medicamentos debido a que cuando un paquete y su contenido llegan al laboratorio analítico, dejan de estar en un ambiente controlado. La exposición al calor, el frío, la humedad, los golpes y la vibración pueden afectar de manera adversa el producto.

Condiciones físicas

Choques entre los envases. Los choques repetidos ocasionan modificaciones fisicoquímicas que no se advirtieron en las muestras que no pasaron por este tratamiento, como cristalizaciones, sedimentaciones, ruptura de emulsiones, etc.

Grandes variaciones de temperatura. El mayor número de casos de inestabilidad de muestras es resultado del efecto de la temperatura, ya que hoy en día la mayoría de las muestras son tomadas en diversos lugares y enviados desde diversos sitios hasta un laboratorio clínico. Si no han sido consideradas las diferentes temperaturas que pueden enfrentar, las muestras son más vulnerables a la inestabilidad.

1.1.4.2. Factores relacionados con la muestra⁶

Propiedades Físicas Y Químicas De Los Metabolitos Y Matriz

Influencia de la matriz.

- a) .Carácter higroscópico de la matriz. La higroscopicidad de la matriz es un factor importante. Cuando la matriz no es higroscópica, su influencia en distintas condiciones de humedad resulta prácticamente nula. Es decir, cuando la matriz es agua o muy higroscópico (sacarosa, glucosa, cloruro de sodio), el metabolito queda prácticamente disuelto en una solución saturada de la matriz, lo que ocasiona una drástica caída en la estabilidad del fármaco y gran sensibilidad del mismo a la humedad ambiental.

Características del metabolito³

- a) Efecto de la cristalinidad en la absorción de agua. La higroscopicidad de los materiales es una característica que en algunos productos da pésimos resultados, pues al atraer la humedad afecta la estabilidad de los metabolitos.

Dependiendo del solvente, temperatura y pH, estos compuestos pueden cristalinizar en varios estados (formas inestables, semiestables o estables). Bajo ciertas condiciones, la transformación de un estado a otro puede ocurrir muy lentamente, así que pueden presentarse simultáneamente

diferentes polimorfos en las preparaciones. La diferentes solubilidades y velocidades de absorción de los polimorfos pueden influir en el efecto terapéutico del medicamento.

- b) Efecto de los sustituyentes. Los efectos de los sustituyentes sobre la velocidad de degradación pueden dividirse fundamentalmente en dos tipos: Efectos polares y efectos estéricos. Los primeros dependen de la clase de los respectivos orbitales electrónicos, y los segundos del tamaño o volumen que éstos ocupan en el espacio.

Los efectos polares se dividen, a su vez, en efectos inductivos y de campo (cuando intervienen electrones involucrados en uniones simples: orbitales σ) y efectos de resonancia (cuando intervienen electrones de uniones dobles: orbitales π , más móviles que los otros).

Las reacciones heterolíticas, puesto que dan lugar a iones, son mucho más sensibles a los efectos polares de los sustituyentes que las reacciones homolíticas.

Muestras Líquidas

Hay diversos factores dentro de la muestra susceptibles de acelerar o disminuir la velocidad de las reacciones e incluso, a veces, de inhibirlas. En este caso, el pH del vehículo y su capacidad para regularlo son fundamentales. También influyen conjuntamente la fuerza iónica del medio y su constante dieléctrica, de modo que puede modificarse absolutamente la estabilidad de una muestra con el cambio en el medio que aumente o disminuya el pH, fuerza iónica o la constante dieléctrica en la forma deseada, para poder lograr retrasar la velocidad de degradación.

pH. La velocidad de degradación de muchos fármacos está estrechamente ligada al pH y quizá sea el factor más importante a tener en cuenta para asegurar su máxima estabilidad. Determinados fármacos pueden ser estables a un pH dado, pero en contacto con otros valores de pH pueden descomponerse.

Constante dieléctrica. Si la reacción de estudio es entre iones, las interacciones electrostáticas contribuyen de manera importante en la constante de velocidad de reacción (K). La reacción de K con la constante dieléctrica D está dada por:

$$\text{Log } k = \text{Log } k^1 - \frac{NZ_A Z_B e^2}{2.3RT.r} \cdot \frac{1}{D} \quad 1.49$$

Donde k^1 es la velocidad de reacción en un medio de constante dieléctrica infinita, Z_A y Z_B son las cargas de los iones, r es la distancia entre estos, T la temperatura y N , e y R son constantes conocidas.

Un gráfico de $\text{Log } k$ vs. $1/D$ (siendo D , la constante dieléctrica del solvente) da una línea recta de pendiente negativa para iones de igual signo, y de pendiente positiva para iones de signo distinto. En consecuencia, el uso de solventes orgánicos miscibles en agua, en los cuales la constante dieléctrica disminuye al aumentar la concentración de solvente orgánico, aumenta la estabilidad del metabolito si la etapa determinante de su degradación implica reactivos de igual carga. Puede predecirse que el uso de mezclas azúcar-agua, tiende a aumentar la inestabilidad de fármacos protonados, sujetos a catálisis básica general o específica en presencia de soluciones amortiguadoras aniónicas, si ésta es la mayor especie catalítica. Casi todos los alcaloides, en

cambio, tienen funciones aminas protonizadas y son susceptibles a hidrólisis ácida; en consecuencia, puede aumentarse su estabilidad disminuyendo la constante dieléctrica.

Si se considera el ataque de un ion sobre una molécula dipolar, la ecuación que se aplica es:

$$\text{Log } k = \text{Log } k^1 + \frac{kZ\mu}{D} \quad 1.50$$

Así, con el aumento de la constante dieléctrica, la velocidad de reacción disminuye para un ion positivo y viceversa.

Si la reacción se produce entre dos moléculas dipolares, la ecuación que se aplica es:

$$\log k = \text{Log } k^1 - \frac{k}{D} \quad 1.51$$

Y una disminución en la constante dieléctrica tiende a disminuir la velocidad de reacción.

Fuerza iónica. La fuerza iónica se define como la semisuma del término obtenido multiplicando la concentración de las especies iónicas presentes en la solución por su valencia elevada al cuadrado. La expresión general, es en primera aproximación, que relaciona la velocidad de reacción con la fuerza iónica está dada por la ecuación de Debye- Hückel:

$$\text{Log } k_i = \text{Log } k_i + \frac{Z_A Z_B A \sqrt{\mu}}{1 + \beta \mu} \quad 1.52$$

Donde μ es la fuerza iónica, k_i^1 , es la constante de velocidad de reacción en un medio de fuerza iónica nula (solución infinitamente diluida) $Z_A Z_B$ son las cargas de los iones, y A y β son funciones de la solución (constante dieléctrica, temperatura, etc.). Una simplificación aplicable en soluciones diluidas es:

$$\text{Log } k_i = \text{Log } k_i + Z_A Z_B A \sqrt{\mu} \quad 1.53$$

Representando $\text{Log } k_i$ en función de la raíz cuadrada de la fuerza iónica, se obtiene una línea recta de pendiente positiva para reacciones de iones de igual signo, y negativa para reacciones de iones de signo opuesto. En este último, la estabilidad puede ser aumentada sólo con incrementar la fuerza iónica mediante el agregado de sales inertes.

Como puede verse en la figura 8, es posible determinar si un incremento en la fuerza iónica aumenta, reduce o no tiene efecto en la velocidad de degradación.

La concentración de sal empleada en una muestra líquida puede incrementar o disminuir la velocidad de degradación del fármaco o no tener efecto. Cuando el fármaco se carga positivamente y está bajo los efectos de la catálisis de iones H^+ , se produce un incremento en la fuerza iónica causada por la adición de una sal y acelera la velocidad de degradación (recta 1, fig. 8). Por el

contrario, la descomposición se retrasa si el metabolito está catalizado por iones OH^- , si se encuentra cargado positivamente y la fuerza iónica se incrementa al agregar una sal (recta 3, fig. 8). Si el metabolito que sufre la degradación es una molécula neutra, cambia su fuerza iónica por la adición de una sal, pero podría no experimentar efecto en la velocidad de degradación, (recta 2, fig. 8)

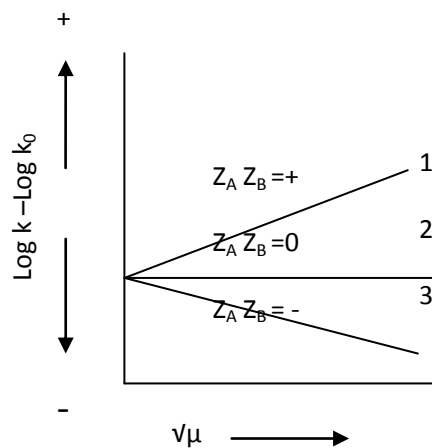


Fig.8 Dependencia de la velocidad de reacción con la fuerza iónica

Incompatibilidades e interacciones. Por interacción se entiende cualquier efecto que se produce recíprocamente, entre dos o más componentes de un sistema y que pueden afectarlo, ya sea de forma positiva o negativa. Las interacciones que pueden conducir a incompatibilidades se producen por:

- Metabolitos entre sí.
- Metabolitos y matriz.
- Metabolitos y matriz con los materiales de empaque.
- Contaminantes de las sustancias utilizadas con metabolitos y matriz.

La incompatibilidad se define como una alteración degradativa de una muestra, que puede ser provocada por interacciones entre dos o más componentes, durante un proceso que ocurre relativamente rápido.

Las incompatibilidades manifiestas: Son las alteraciones que se perciben con los sentidos, como ocurre con las alteraciones de solubilidad y dispersión (turbidez, precipitación, agregación, etc.), alteraciones de la viscosidad y la consistencia (solidificación, fluidificación, etc.) y alteraciones de color, olor y sabor.

Incompatibilidades invisibles u ocultas: Son las alteraciones no perceptibles por los órganos de los sentidos. Sólo es posible detectarlas e investigarlas mediante ensayos adecuados de actividad y liberación, sobre todo, de los fenómenos físico-químicos que perjudican el valor del metabolito (como la formación de complejos solubles y asociados, o las adsorciones). Dos sustancias que sean incompatibles a concentraciones más bajas. Por otra parte, hay que tomar en cuenta que al disminuir la concentración de las sustancias, algunas incompatibilidades manifiestas pueden transformarse en incompatibilidades invisibles u ocultas.

La degradación del principio activo es un fenómeno resultante entre otros factores, de la interacción metabolito-excipientes. Hay otro fenómeno importante de la interacción con el excipiente, que es la formación de complejos. Si bien esto no altera el contenido químico del fármaco en sí, puede modificar su disponibilidad biológica.

Interacción metabolito-excipientes. El álcali de los envases de vidrio, los metales pesados de los envases metálicos, varios componentes de los tapones de los envases, etcétera, pueden penetrar en las preparaciones e inducir o acelerar reacciones de descomposición.

Naturaleza Del Contenedor O Envase

La finalidad del envase es proteger eficazmente la muestra de los factores degradantes externos e, indirectamente, también de los internos. En los casos en los que se liberan compuestos volátiles, que aceleran o catalizan la degradación, un envase que permita su eliminación será más eficaz para prolongar la estabilidad del producto que un recipiente hermético.

El envase, así como también el proceso de envasado, condicionan la estabilidad y, en consecuencia, los estudios al respecto deben hacerse con el producto envasado en el mismo recipiente y con el mismo procedimiento de envase que se utiliza en la industria.

Tipos De Envase⁷

Recipientes de plástico. Están compuestos por polímeros como: polímeros de alta densidad, media y baja; cloruro de polivinilo, polipropileno y polietileno. Como consecuencia de la creación de más y menores materiales debe tenerse en cuenta que muchos plásticos tienen componentes que se han añadido al producto por polimerización, y pueden pasar al contenido del recipiente. Además de estas sustancias, el plástico tiene componentes de bajo peso molecular que son consecuencia del proceso de polimerización incompleto.

1.1.4.3. Alteraciones físicas⁸

Durante su almacenamiento y como consecuencia de variaciones ambientales, pueden producirse transformaciones polimórficas no perceptibles organolépticamente, pero que implican casi siempre alteraciones en los procesos de liberación y resorción.

Alteración en la homogeneidad de la distribución. Por efecto de la gravedad puede producirse separación de los componentes en los sistemas líquidos que, al principio, sólo puede comprobarse microscópicamente por un cierto grado de irregularidad en la dispersión, pero pasado el tiempo, llegan a hacerse visibles macroscópicamente como sedimentación o separación de fases.

Alteración del comportamiento en cuanto a solubilidad. En los sistemas de dispersión molecular, puede producirse alteraciones de la concentración debidas a pérdidas del disolvente (recipientes insuficientemente cerrados o permeables a los gases) o de variaciones de temperatura;

puede sobrepasarse así el límite de solubilidad y dar lugar con ello a la separación de las sustancias disueltas (cristalización, precipitación).

1.1.4.4. Alteraciones químicas^{5,8}

Las reacciones químicas que perjudican la conservación, como la hidrólisis, oxidaciones, reducciones, esterificaciones, descarboxilaciones, polimerizaciones, etc. pueden presentarse en sistemas homogéneos o en sistemas heterogéneos.

La mayor parte de las alteraciones de los metabolitos y/o principios activos se pueden clasificar en dos grandes grupos: La hidrólisis y la oxidación. Otro grupo que tiene importancia es la isomerización, especialmente la racemización, esta última comúnmente puede tratarse como cualquier reacción térmica de primer orden, mientras otros tipos de isomerización son más difíciles de tratar.

Hidrólisis. La hidrólisis es uno de los procesos de descomposición más frecuentemente encontrados.

La presencia de un solvente, puede remover moléculas de los cristales y contribuir a su degradación solvólítica. En estos casos los aspectos limitantes pueden ser la transferencia de humedad sobre o dentro del cristal.

Estos solventes, actúan como agentes nucleofílicos y atacan centros electropositivos en la molécula del fármaco. Las reacciones de solvólisis más comúnmente encontradas en la inestabilidad de los fármacos son aquellas que involucran compuestos carbonilos lábiles como ésteres, lactonas y lactamas.

Mecanismo de reacción. Las reacciones hidrolíticas de degradación ocurren más o menos, por los mismos mecanismos de reacción. La hidrólisis de ésteres se produce por ruptura de la unión covalente de un átomo de carbono con otro de oxígeno. Este proceso que se cumple espontáneamente e inexorablemente, aunque casi siempre en forma lenta, es acelerado por la presencia de catalizadores.

En tanto que la hidrólisis ácida constituye una reacción de equilibrio, la hidrólisis catalizada por base se da en un sentido solamente, debido a la formación de un anión ácido de carga estabilizada.

Desde un punto de vista cinético, las reacciones hidrolíticas son de segundo orden, ya que las velocidades de reacción son proporcionales a la concentración de los compuestos reaccionantes. Sin embargo, en soluciones, el agua está presente en gran exceso y se mantiene a una concentración relativamente constante. Para fines experimentales las reacciones en éstos tipos de soluciones pueden ser consideradas mono moleculares o de primer orden. Usando esta simplificación, es posible calcular el grado de descomposición bajo condiciones experimentales.

Oxidación. El oxígeno es el más abundante de los elementos. Con tanto oxígeno alrededor no es raro que estén presentes reacciones de oxidación, completas y potenciales.

Uno de los principales problemas encontrados con las reacciones de oxidación es que algunos reactivos, tales como el oxígeno o los iones metálicos sólo requieren estar presentes en cantidades trazas para provocar problemas significativos en la estabilidad.

Otro aspecto importante de la descomposición oxidativa es la tendencia de muchos fármacos y/o metabolitos a formar productos coloreados o producir olores desagradables. No obstante, si ocurre un muy bajo nivel de degradación oxidativa, ésta puede ser químicamente insignificante.

Mecanismo de la oxidación. La oxidación, es una interacción entre el fármaco A y el oxígeno. Sin embargo, las reacciones de oxidación son usualmente la suma de una serie de reacciones (reacciones en cadena). Frecuentemente las oxidaciones son catalizadas por iones metálicos.

La forma más común de oxidación que ocurre en las muestras es la autooxidación a través de un mecanismo de radicales libres. La auto-oxidación se produce espontáneamente y en condiciones ordinarias aunque también pueden actuar factores externos como la luz, calor, radiaciones y agentes catalíticos que la aceleran.

El mecanismo de la autooxidación se lleva a cabo mediante reacciones en cadena misma que comprenden los siguientes pasos:

El primer paso de la autooxidación se denomina iniciación y toma un periodo de tiempo llamado periodo de inducción. La duración de este periodo depende de la reacción y de las condiciones de la misma.

El segundo paso es la propagación, ocurre la formación de hidroperóxidos y, como en el primer paso, puede ocurrir catálisis por metales pesados tales como hierro y cobre, provenientes de impurezas en las muestras.

El paso final es la terminación. Las reacciones ocurren hasta que se rompe la cadena.

Los metales pesados (cobre, hierro, cobalto y níquel) catalizan la oxidación por acortamiento del periodo de inducción y también afectan la velocidad de oxidación por favorecer la formación de radicales libres.

Fotolisis. La reacción fotoquímica es una fuente de degradación de los fármacos muy importante en el tiempo de almacenaje. Consideramos la luz (natural y artificial) como única fuente de radiación ultravioleta y visible.

Si la molécula que adsorbe la radiación reacciona, se dice que la reacción es fotoquímica. Cuando las moléculas adsorbentes no participan de modo directo en la reacción sino que transfieren su energía a otras moléculas que reaccionan, se dice que la sustancia absorbente es foto sensibilizada.

Una de las condiciones para que la reacción fotoquímica se produzca es que la molécula tenga niveles máximos de absorción en la zona de longitud de onda de la fuente de radiación.

La descomposición de los productos resultantes de la absorción de la energía radiante en forma de luz ha adquirido importancia debido a la estructura química compleja de los fármacos.

Catálisis. La velocidad de una reacción química es frecuentemente acelerada por la presencia de sustancias que se llaman catalizadores. Un catalizador es una sustancia que influye en la velocidad de una reacción sin ser cambiado químicamente por ella. Cuando un catalizador disminuye la velocidad de una reacción, se denomina catalizador negativo.

Se considera que la catálisis opera de la siguiente manera. El catalizador se combina con el reactivo, conocido como sustrato y forma un intermediario llamado complejo activado, el cual se descompone para regenerar el catalizador y dar los productos. De este modo el catalizador disminuye la energía de activación cambiando el mecanismo del proceso y la velocidad, por consiguiente, se ve aumentada.

Catálisis homogénea. Es aquella donde el catalizador y los reactivos están en la misma fase.

Catálisis heterogénea. Es aquella donde el catalizador y los reactivos forman fases separadas en la mezcla. El catalizador puede ser un sólido finamente dividido tal como platino o puede ser la pared del contenedor. La catálisis ocurre en la superficie del sólido y en este caso se denomina catálisis de contacto. Las moléculas reaccionantes son adsorbidas en varios puntos o centros activos sobre la superficie del catalizador. La adsorción de las moléculas reaccionantes por el catalizador debilita los enlaces químicos de estas y disminuye la energía de activación. Las moléculas activadas reaccionan y los productos de dicha respuesta difunden lejos de la superficie del catalizador.

Los catalizadores pueden ser eliminados por sustancias extrañas que son adsorbidas fuertemente en los centros activos de la superficie del catalizador donde estarían normalmente los reactivos durante la reacción.

Catálisis ácido-base específica. Muchas reacciones en solución son catalizadas por iones hidrógeno u oxidrilo y muchos principios activos no son estables fuera de un margen estrecho de pH. La catálisis de una reacción química por iones hidrógeno y oxidrilo es conocida como catálisis ácido-base específica.

Pirolisis. Se entiende por tal la ruptura de una molécula por acción del calor, de manera que en los productos resultantes no aparece ningún grupo adicional. Las reacciones más comunes son la descarboxilación y la deshidrogenación.

Descarboxilación. La descarboxilación consiste en la pérdida de dióxido de carbono de una sustancia química, tales como los ácidos carboxílicos. La descarboxilación ocurrirá más fácilmente si el grupo R (RCOOH) es un electro atrayente tal como -fenil, -CN, C=O.

La descarboxilación depende del pH. La estabilización es posible mediante el ajuste de la solución a un valor de pH correspondiente a la degradación mínima, protección contra la luz y evitando todo efecto térmico.

1.1.4.5. Alteraciones microbiológicas.

Las muestras se contaminan por la presencia constante de microorganismos en el ambiente, en las propias muestras y matriz, así como en el envase empleado para su almacenamiento.

Junto con la aparición de mohos, turbidez, malos olores y fermentaciones, existe el peligro de la producción de sustancias metabólicas tóxicas (pirógenos). Además las bacterias y hongos son capaces de producir alteraciones químicas en las sustancias, o por lo menos, inducir las o fomentarlas lo cual puede conducir igualmente a una disminución o pérdida de la estabilidad.

1.2. DROGADICCIÓN

1.2.1. SITUACIÓN EN MÉXICO

El consumo de drogas en México ha ido en aumento progresivamente cada vez más con las situaciones de violencia que se presentan y su consiguiente saldo de personas ingresadas a centros hospitalarios por hechos vinculados a este consumo.

De acuerdo a estudios realizados, el consumo se inicia a partir de los 12 años, y aumenta entre los 16 y los 21 años. De los delitos relacionados con el consumo de drogas, los de carácter violento son más fácilmente cuantificables.

Marihuana. De 2000 a 2008, se aprecia una tendencia al descenso como droga de inicio, pese a que de 1998 a 2000 ocupó el primer sitio en centros de tratamiento para ser desplazada a partir de 2002 por el alcohol.^{9, 10}

Como droga de uso actual, ha mostrado variaciones desde 2000 hasta el 2008, alcanzando en 2000 su pico máximo (27.3%) para ir disminuyendo paulatinamente hasta alcanzar su menor proporción 2005 con tan solo 14.3% de los individuos. Asimismo, hay incremento de su consumo en 2007 (22.1%) y de nuevo un descenso para el 2008 con 18.6%.⁹ Como se muestra en la figura 9.0.

Cocaína. Se mantiene como droga de inicio conservando un incremento progresivo a partir de 2000 (0.9%) hasta 2003 (8.5%), estabilizándose hasta el 2005 con un 12.9% anual. Con relación a la droga de uso actual vale la pena señalar que en la mayoría de los años analizados se ha reflejado como la sustancia de mayor uso.⁹

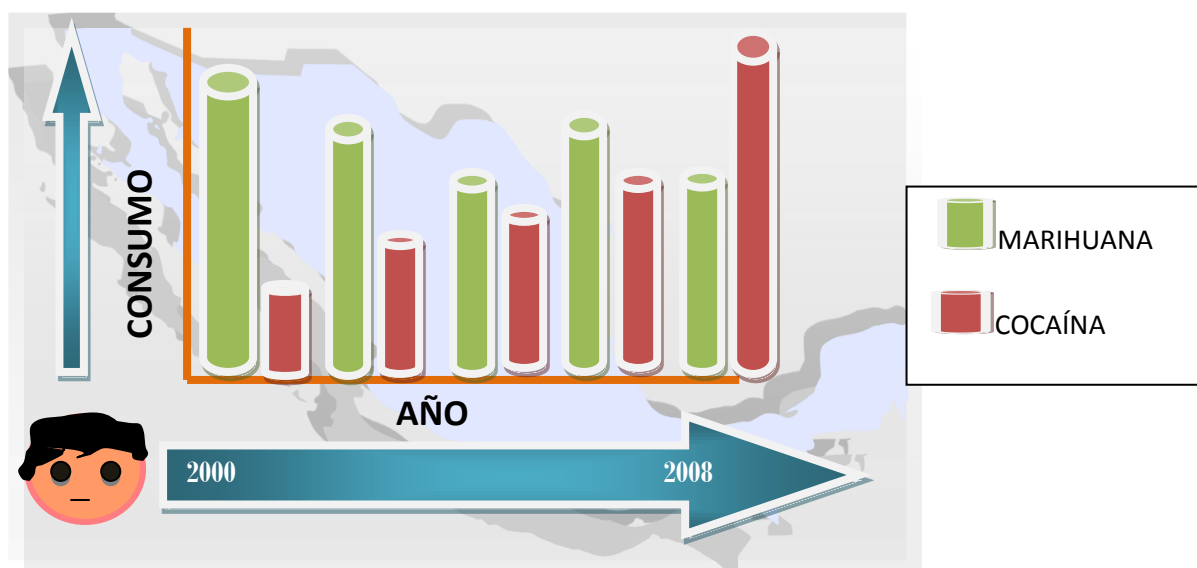


Fig.9.0 Consumo de Drogas en México

1.2.2. DROGAS DE ABUSO⁹

El abuso de drogas puede tener su origen en el *médico* y en el *paciente* que busca tratamiento médicamente hablando o en el adolescente que experimenta con drogas. El mal uso generado por el médico puede ocurrir cuando no hay suficiente preocupación o tiempo para evaluar de manera adecuada al paciente como candidato para el tratamiento con drogas psicoactivas. Es muy frecuente que el tratamiento se dirija a aliviar los síntomas sin un esfuerzo concertado por identificar posibles causas profundas y responder a las necesidades emocionales y médicas del paciente.

Algunos de los factores citados con mayor frecuencia como conductores al mal uso de drogas por los adolescentes son la presión de los compañeros, la alineación, el hedonismo, la publicidad de los medios de difusión masiva, la abundancia y el aburrimiento. El consumo de bebidas alcohólicas, el cigarrillo y el uso liberal de sedantes, tranquilizantes y estimulantes del sistema nervioso central (SNC) por los adultos, en particular los miembros de la familia, estimula el desarrollo de una actitud arrogante hacia las drogas y aumenta la probabilidad del consumo entre los adolescentes.

Algunos estudios recientes indican que un pequeño porcentaje de la población puede tener una predisposición genética a desarrollar una adicción como mínimo a una droga, el alcohol. Sin embargo, está muy claro que algunos adictos potenciales pueden resistir a entrar en este camino si toman conciencia de las consecuencias toxicológicas del abuso de drogas.

1.2.2.1. Generalidades

1.2.2.1.1. Definición

Diversas organizaciones han definido y redefinido el abuso y la adicción. Los motivos de estos desacuerdos consisten en que abuso y adicción son síndromes conductuales que se extienden a lo largo de una escala que abarca desde el consumo mínimo hasta el abuso adictivo del consumo. En el presente trabajo nos referimos a la adicción como al estado psicofísico causado por la interacción de una persona con un fármaco, caracterizado por modificación del comportamiento y otras reacciones que comprenden siempre un impulso irreprimible por tomar el fármaco en forma continua o periódica, a fin de experimentar sus efectos psíquicos y otros, así como evitar el malestar producido por la privación.

El término droga se utilizó en la farmacología clásica para designar a un medicamento en estado bruto tal y como aparece en la naturaleza. En el año 1969, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo definió como “toda sustancia, terapéutica o no, que introducida en el organismo por cualquier vía es capaz de actuar sobre el sistema nervioso central (SNC) hasta el grado de alterar la conducta del individuo que la consume”.

En 1982, la OMS intentó delimitar cuáles serían las sustancias que producían dependencia y declaró como drogas de abuso “aquellas de uso no médico, con efectos psicoactivos (capaz de producir cambios en la percepción, el estado de ánimo, la conciencia y el comportamiento) y son susceptibles de ser auto administradas.

Estos conceptos dados por la OMS sobre la droga obedecen a aspectos médicos, sociológicos y jurídicos, esto es que al término droga se le da una conceptualización muy amplia para abarcar la relación entre una sustancia y los efectos dañinos que provocan a una persona como parte de la sociedad.

1.2.2.1.2. Clasificación¹¹

Dentro del título de la Ley General de Salud que se refiere al control de productos, servicios, su importación o exportación; se encuentra el capítulo V relativo a estupefacientes. En la tabla 1.5 se encuentran descritos los estupefacientes considerados así por la ley General de Salud en el artículo 234.

Tabla 1.5. Estupefacientes según ley general de Salud artículo 234.

ACETILDIHIDROCODEINA	BECITRAMIDA
ACETILMETADOL	BENCETIDINA
ACETORFINA	BENCILMORFINA
ALFACETILMETADOL	BETACETILMETADOL
ALFAMEPRODINA	BETAMEPRODINA
ALFAMETADOL	BETAMETADOL
ALFAPRODINA	BETAPRODINA
ALFENTANIL	BUPRENORFINA
ALILPRODINA	FENADOXINA
ANILERIDINA	FENANPROMIDA
BUTIRATO DE DIOXAFETILO	FENAZOCINA
CANNABIS	FENMETRAZINA
CETOBEMIDONA	FENOMORFAN

CLONITACENO	FENOPERIDINA
COCA	FENTANIL
COCAINA	FOLCODINA
CODEINA	FURETIDINA
CODOXIMA	HEROÍNA
CONCENTRADO DE PAJA DE ADORMIDERA	HIDROCODONA
DESOMORFINA	HIDROMORFINOL
DEXTROMORAMIDA	HIDROMORFINA
DEXTROPROPOXIFENO	HIDROXIPETIDINA
DIAMPROMIDA	ISOMETADONA
DIETILTAMBUTENO	LEVOFENACILMORFAN
DIFENOXILATO	LEVOMORAMIDA
DIFENOXINA	LEVORFANOL
DIHIDROCODEINA	METADONA
DIHIDROMORFINA	METAZOCINA
DIMEFEPTANOL	METILDESORFINA
DIMENOXADOL	METILDIHIDROMORFINA
DIMETILTAMBUTENO	METILFENIDATO
DIPIANONA	METAPON
DROTEBANOL	MIROFINA
ECGONINA	MORAMIDA
ETILMETILTAMBUTENO	MORFERIDINA
ETILMORFINA	MORFINA
ETONITACENO	MORFINA BROMOMETILATO
ETORFINA	NICOCODINA
ETOXERIDINA	PETIDINA
NICODICODINA	PENTAZOCINA
NICOMORFINA	PIMINODINA
NORACIMETADOL	PIRITRAMIDA
NORCODEINA	PROHEPTACINA
NORLEVORFANOL	PROPERIDINA
NORMETADONA	PROPIRAMO
NORMORFINA	RACEMETORFAN
NORPIANONA	RACEMORAMIDA
N-OXIMORFINA	RACEMORFAN
OPIO	SUFENTANILO
OXICODONA	TEBACON
OXIMORFINA	TEBAINA
PAJA DE ADORMIDERA	TRIMEPERIDINA
TILIDINA	TRIMEPERIDINA

Además de los isómeros de los estupefacientes, a menos que estén expresamente exceptuados.

Cualquier otro producto derivado o preparado que contenga sustancias señaladas en la lista anterior, sus precursores químicos y, en general, los de naturaleza análoga y cualquier otra sustancia que determine la Secretaría de Salud o el Consejo de Salubridad General. Las listas correspondientes publicadas en el Diario Oficial de la Nación.¹¹

De acuerdo al grado de dependencia se pueden clasificar como aquellas que provocan dependencia física y psicosocial, es decir, que alteran el comportamiento psíquico y social del adicto (Depresores del sistema nervioso central); y aquellas que crean únicamente una dependencia psicosocial, (Estimulantes del sistema nerviosos central).

Tipos De Drogas Según Sus Efectos

DEPRESORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).^{12, 13}

a) Narcóticos (OPIÁCEOS). A pesar de que esta palabra se usa con frecuencia para referirse a todo tipo de drogas psicoactivas, es decir, aquellas que actúan sobre el psiquismo del individuo, el campo de los narcóticos se pueden dividir en la actualidad en varios grupos, que son los siguientes:

- Opio, opiáceos y sucedáneos sintéticos.
- Neurolépticos o tranquilizantes mayores.
- Ansiolíticos o tranquilizantes menores.
- Somníferos o barbitúricos.
- Grandes narcóticos o anestésicos generales.

Se trata de drogas con composiciones y orígenes distintos, que tienen en común su efecto en el organismo, aunque éste se manifieste en manera y en grado diferentes.

Pero el elemento fundamental que las une consiste en que todos los narcóticos causan adicción física.

Neurolépticos o tranquilizantes mayores. Se trata de sustancias utilizadas para tratar la depresión, las manías y las psicosis. Sumamente tóxicos, poseen efectos secundarios tales como parkinsonismo, destrucción de células de la sangre, arritmia cardíaca, anemia, obstrucción hepática, vértigos, retención urinaria, estreñimiento, irregularidad menstrual, atrofia testicular, congestión nasal, bruscos ataques de parálisis muscular, síndromes malignos como hipertermia y muerte inesperada.

Ansiolíticos o tranquilizantes. Habitualmente usados para tratar las neurosis. En dosis mayores funcionan como hipnóticos o inductores del sueño; también algunos se usan como relajantes musculares.

Producen letárgia, estupor y coma, con relativa facilidad. En caso de adicción pueden inducir a la aparición de alteraciones hemáticas. Al abandonar su consumo pueden aparecer episodios depresivos, desasosiego o insomnio, que suelen ser muy duraderos.

Somníferos o barbitúricos. Su uso puede provocar lesiones en el hígado o en los riñones, producir erupciones cutáneas, dolores articulares, neuralgias, hipotensión, estreñimiento y tendencia al colapso circulatorio.

La intoxicación aguda puede llegar a provocar la muerte, que sobreviene por la lesión del cerebro debida a la falta de oxígeno y a otras complicaciones derivadas de la depresión respiratoria.

La dependencia física se genera entre las cuatro y seis semanas. Con frecuencia, el síndrome de abstinencia suscita cuadros de delirium tremens.

Grandes Narcótico. Existen varias sustancias usadas en anestesia general que merecen estar incluidas en este grupo por su capacidad de producir estupefacción, mayor que la de cualquier estupefaciente en sentido escrito. En dosis leves produce una primera fase de excitación cordial, como el alcohol, y luego sedación y sopor.

También generan tolerancia y, en consecuencia, adicción, pudiendo ocasionar intoxicaciones agudas e incluso la muerte.

Opio y derivados. Con el nombre popular de adormidera o amapola se conoce el fruto del cual se obtiene el opio y sus derivados.

Este narcótico produce un estado de euforia y ensoñación; una sensación de éxtasis que se acorta rápidamente a causa de la tolerancia. Al poco tiempo de uso, los adictos experimentan síntomas de abstinencia entre una y otra toma, que se caracterizan por presentar un cuadro pseudo-gripal en el curso de las primeras 12 horas, estornudo, sudoración, lagrimeo, bostezo y dolores musculares. Luego de 36 horas de abstinencia los síntomas se intensifican. Aparecen escalofríos, sofocos, insomnio, diarrea, incremento del ritmo cardíaco y presión sanguínea.

El opio produce adicción, tolerancia y dependencia física y psíquica. La intensidad del síndrome de abstinencia, y su gravedad, depende de varios factores: tipo de droga, tiempo de uso, personalidad del consumidor, etc. Los primeros síntomas comienzan a parecer ocho horas después de la última dosis de lagrimeo, sudoración, bostezo y sueño agitado.

Alucinógenos. Las drogas conocidas como alucinógenos son fármacos que provocan alteraciones psíquicas que afectan a la percepción.

Los alucinógenos se consideran productos psicodélicos que inhiben los mecanismos de defensa del yo, y facilitan la distribución de la sensibilidad así como la aparición de imágenes desconcertantes.

LSD (ácido lisérgico). En un principio fue utilizado con fines terapéuticos en alcohólicos, cancerosos y otros enfermos terminales para ayudarles a superar el trance.

Algunos usuarios experimentan pensamientos y visiones aterradoras que crean en ellos tal pánico que muchos han saltado al vacío provocando su propia muerte para huir de estas sensaciones que identifican como un peligro real.

Éxtasis o Mdma. La metilendioximetanfetamina (MDMA), normalmente conocida como "éxtasis", "ectasi" o "X-TC", es una droga sintética psicoactiva con propiedades alucinógenas de gran potencial emotivo y perturbador psicológico, con propiedades similares a las anfetaminas.

Su estructura química (3-4 metilendioximetanfetamina) se asemeja a la estructura de la metilendioxianfetamina (MDA) y de la metanfetamina, otros tipos de drogas sintéticas causantes de daños cerebrales.

El éxtasis produce efectos psíquicos de gran potencial perturbador. Inicialmente el sujeto experimenta sensaciones de confianza y excitación, a las que sigue un estado de hiperactividad e

incremento en los pensamientos morbosos. Los efectos del estimulante se diluyen provocando trastornos psicológicos, como confusión, problemas con el sueño (pesadillas e insomnio), deseo incontenible de consumir nuevamente drogas, depresión, ansiedad grave y paranoia.

Entre los síntomas físicos pueden citarse: anorexia, tensión y trastornos musculares similares a los presentes en la enfermedad de Parkinson, bruxismo, náuseas, visión borrosa, desmayos, escalofríos y sudoración excesiva (este último signo es característico durante la intoxicación).

Metanfetamina. La droga acelera el sistema nervioso, haciendo que el cuerpo utilice la energía acumulada. Al no descansar lo suficiente y dejar de alimentarse (por la pérdida del apetito), causa daño permanente a la salud.

Los efectos que causa al cuerpo varían de acuerdo a la cantidad de droga utilizada. Entre los síntomas observados se encuentran los siguientes: lesión nasal cuando la droga es inhalada; sequedad y picor en la piel; acné; irritación o inflamación; aceleración de la respiración y la presión arterial; lesiones del hígado, pulmones y riñones; extenuación cuando se acaban los efectos de la droga (necesidad de dormir por varios días); movimientos bruscos e incontrolados de la cara, cuello, brazos y manos; pérdida del apetito; depresión aguda cuando desaparecen los efectos de la droga.

Mda. La MDA, el fármaco de origen de la MDMA, es una droga similar a la anfetamina que también ha sido objeto de abuso, presentando efectos psico-físicos similares a los de la MDMA.

Marihuana. Su componente psicoactivo más relevante es el delta-9-tetrahidrocannabinol (delta-9-THC), conteniendo la planta más de sesenta componentes relacionados. La tolerancia está acreditada, siendo cruzada cuando se consume conjuntamente con opiáceos y alcohol. Respecto a la dependencia, se considera primordialmente psíquica. Los síntomas característicos de la intoxicación son: ansiedad, irritabilidad, temblores, insomnios, muy similares a los de las benzodiazepinas.

La potencia de la droga se mide de acuerdo a la cantidad promedio de THC que se encuentra en las muestras de marihuana que confiscan las agencias policíacas.

La marihuana común contiene un promedio de 3 % de THC, pudiendo alcanzar el 5,5 %. La resina tiene desde 7.5 %, llegando hasta 24 %.

El THC afecta a las células del cerebro encargadas de la memoria. Eso hace que la persona tenga dificultad en recordar eventos recientes (como lo que sucedió hace algunos minutos), y hace difícil que pueda aprender mientras se encuentra bajo la influencia de la droga. Para que una persona pueda aprender y desempeñar tareas que requieren de más de dos pasos, es necesario que tenga una capacidad normal de memoria a corto plazo. Estudios recientes demuestran que la marihuana crea disfunciones mentales y disminución de la capacidad intelectual en las personas que la fuman mucho y por muchos años.

ESTIMULANTES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC) ^{12,13}

Tradicionalmente usados para combatir la fatiga, el hambre y el desánimo, los estimulantes provocan una mayor resistencia física transitoria gracias a la activación directa del sistema nervioso central.

Estimulantes vegetales. Los efectos de la intoxicación crónica padecen cirrosis, agitación, angustia, temblores, insomnio, náuseas y vómito.

Aunque los estimulantes vegetales son considerados inocuos, conviene moderar su consumo ya que se trata de sustancias tóxicas susceptibles de producir efectos secundarios nocivos.

Estimulantes químicos.

Cocaína. Es un alcaloide estimulante cerebral extremadamente potente, de efectos similares a las anfetaminas. Además, es un enérgico vasoconstrictor y anestésico local, siendo absorbido por las mucosas nasales cuando se aspira, se metaboliza en el hígado y se elimina por la orina. Actuando directamente sobre el cerebro. Sus efectos fisiológicos inmediatos son: sudoración, aumento en la potencia muscular, midriasis, incremento de actividad cardíaca y presión sanguínea, dilatación de los vasos sanguíneos periféricos, convulsiones, aumento en el ritmo respiratorio y de la temperatura corporal. Estos síntomas pueden provocar la muerte por paro cardíaco o fallas respiratorias. Además se presentan irritaciones y úlceras en la mucosa nasal. Comúnmente causa congestión nasal, que puede presentarse o no con secreción líquida.

Anfetaminas. Presentan una elevada tolerancia, que produce habituación y necesidad de dosis progresivamente más elevadas.

El consumo de anfetaminas produce en el cuerpo aceleración del ritmo cardíaco y pulmonar, dilatación de pupilas, reduce el apetito, produce sequedad en la boca, sudores, dolores de cabeza, pérdida de visión, mareos, insomnio, ansiedad.

1.2.2.1.3. Metabolitos ^{8, 14,15}

En todos los fluidos biológicos se encuentra en potencia los metabolitos de los fármacos. Este fenómeno ha sido en particular expuesto desde el advenimiento de métodos cromatográficos de separación. Antes de que estos métodos fueran introducidos, los métodos clásicos de análisis utilizados para incluir metabolitos eran los mismos que para los fármacos porque sus propiedades fueron con naturalidad similares para la droga bajo investigación.

Se ha demostrado que independientemente de los mecanismos desarrollados por el organismo para protegerlo en contra de ciertos compuestos que actúan sobre cuerpos extraños que de cierta manera serían tóxicos, el organismo es desafiado con un compuesto nuevo, transformándolo y la mayor parte de estas transformaciones dan como resultado compuestos más solubles que deberían ser más fácilmente excretados.

Las etapas del metabolismo han estado clasificadas en dos fases. En la primera fase la droga es atacada por una sola enzima para efectuar un cambio simple en su estructura. Tales reacciones son usualmente oxidaciones, reducciones, o se hidrolizan y usualmente dan como resultado una estructura con un grupo funcional, el cuál es utilizado en la segunda fase. La segunda fase implica un grado sintético donde una función soluble en agua se suma al grupo funcional de la droga o el metabolito de la fase I, para formar una molécula conjugada soluble en agua que es fácilmente excretada por el cuerpo a través de la orina. El sitio principal de la fase de metabolismo es el hígado, aunque otros tejidos finos también pueden ser capaces de estas transformaciones.

Fase I Del Metabolismo

Los compuestos aromáticos son metabolizados por la hidroxilación directa. Si hay un sustituyente ya presente en el anillo aromático entonces la hidroxilación puede inducir un desplazamiento de este sustituyente para la siguiente posición.

Los alcoholes están adicionalmente oxidados a aldehídos y acetonas; a su vez los aldehídos son oxidados a ácidos. Así el metabolismo de una cadena lateral alifática procederá por esta serie de oxidaciones a producir una mezcla complicada de ácidos.

Fase II Del Metabolismo

El fármaco o el metabolito se encuentra conjugado con ácido glucoronico. La conjugación puede tener lugar por medio de una conexión con éter y fenoles.

Los derivados altamente hidrosolubles son rápidamente excretados en la orina y es un método muy eficiente de eliminar de otra manera compuestos relativamente extraños e insolubles.

Alternativamente la conjugación puede estar por medio de una conexión de tipo de éster con ácidos carboxílicos. Una característica de tales moléculas conjugadas es que son fácilmente hidrolizadas por álcali diluido y por consiguiente pueden ser la causa de niveles altos anormales de droga inalterada en orina, lo cual es alcalino.

La Fase I y Fase II, son, por supuesto, no mutuamente exclusivas. Puede verse que la reacción bien podría proveer un sustrato adecuado para otro y una secuencia de reacciones podría ser asumido como premisa incorporando un número de estos pasos. Por otra parte, la molécula de la droga puede estar sujeta a varias conversiones diferentes.

Sin embargo, la extensión de cualquier reacción particular o la cadena de reacciones dependerán de la habilidad de la droga y metabolitos a actuar como sustratos para la enzima particular y la rapidez por la cual la droga o el metabolito intermedio es obtenido de los sitios que metaboliza.

Esta descripción está dirigida a dar una idea del alcance metabólico que puede tener lugar para moléculas de drogas y de ninguna manera trata de mostrar cómo podría predecir el metabolismo de cualquier compuesto particular.

El Significado De La Formación Del Metabolito Para Su Análisis

Los métodos de análisis de drogas en fluidos biológicos, como fluorimetría o adsorción ultravioleta, tienden a incluir metabolitos para su determinación ya que estos compuestos tienen estructuras similares para la droga bajo estudio. Es importante considerar la posibilidad de la interferencia por metabolitos en los métodos particulares de análisis.

También puede ser importante en análisis de droga, si los compuestos son equiactivos, entonces puede ser permisible tolerar una prueba que mide ambos en combinación. Un cuadro mucho más claro emerge si la droga y el metabolito pueden ser determinados separadamente.

Presencia De Otras Drogas

Hidrólisis de Moléculas Conjugadas

Como ya se mencionó más arriba, tanto drogas como metabolitos están conjugados con ácidos orgánicos e inorgánicos, por mucho tiempo en investigación de drogas se consideró que tal conjugación fuera un paso final en el metabolismo antes de su excreción inmediata y es usual hidrolizar la muestra para medir la droga total, en particular en muestras de orina. En general, los ácidos diluidos o las bases son métodos aceptables. Sin embargo, el fármaco mismo puede ser inestable para tales métodos, o la hidrólisis no puede ser completa. Esto tiene la ventaja de que si la preparación de la enzima es suficientemente específica, dará información de la molécula conjugada que es hidrolizada.

1.2.2.2. Cocaína^{15,16}

La cocaína es el alcaloide principal de las hojas de *coca Erythroxylon Lam* o *Erythroxylon*

Las hojas de coca contienen aproximadamente 0,5-2% de alcaloides totales, entre los que se encuentran:

- a. *Derivados tropánicos.* Cocaína (metil-benzoil-ecgonina) constituyendo el 50-94%, de cinamil cocaína (metil-cinamil ecgonina); α y β truxilinas (estéreo-metil ecgonina de los ácidos α y β truxílicos); tropa cocaína (éster benzoílico de la pseudotropina)
- b. *Derivados de Pirrol.* Higrina, β -iurina, cusphigrina. Otras sustancias encontradas en las hojas son: ácido cocatánico, proteínas, minerales (calcio), vitaminas, ácidos grasos, aceites esenciales, ceras, salicilato de metilo, acetona y alcohol metílico.

De los alcaloides contenidos en las hojas de coca; la cocaína, cinamilcocaína y α y β truxilinas son los más importantes. Estos se hallan en diferentes proporciones en las distintas variedades comerciales.

Aspectos Químicos.

La cocaína ($C_{17}H_{21}O_4N$); se define como un alcaloide porque tiene las características clásicas de éstos; es una base nitrogenada capaz de formar sales en ácidos orgánicos e inorgánicos, tiene origen vegetal y actividad farmacológica definida.

Pertenece al grupo de los alcaloides tropánicos, su núcleo fundamental es el tropano el cual es el producto de la condensación de un anillo de miembros o pirrolidinico y otros seis miembros o piperidinico con tres átomos comunes, dos de carbono y uno de nitrógeno.

El nitrógeno que cumple la función de puente contiene un grupo metil. Del tropano deriva la ecgonina que presenta un radical hidroxilo (OH) en el carbono 3 y un grupo carboxílico (COOH) en posición 2; siendo por tanto el 3-hidroxi-2-carboxi-tropano.

La ecgonina puede formar ésteres con los alcoholes mediante su radical carboxi (derivado de ácido metánico) y con los ácidos por medio del grupo OH presente en la molécula. El éster doble producto de la reacción con alcohol metílico y ácido benzoico es la cocaína (figura 9)

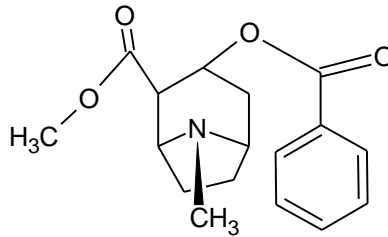
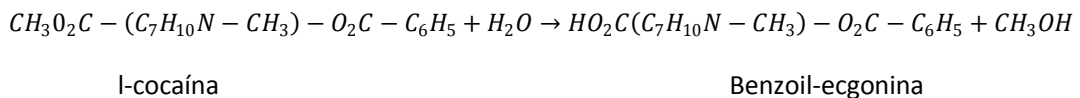


Fig. 9 Estructura de Cocaína

La cocaína es un estimulante y un anestésico local con propiedades vasoconstrictoras potentes. Produce efectos psicológicos y de comportamiento cuando se administra por vía oral, intranasal, intravenosa o inhalatoria. Tiene efectos farmacológicos potentes sobre las neuronas dopaminérgicas, noradrenérgicas serotoninérgicas del sistema nervioso central. Estos efectos consisten en alteración y bloqueo del transporte de la membrana celular e inhibición de la recaptación de aminas biógenas

1.2.2.2.1. Benzoilecgonina.

Es el principal metabolito de degradación de la cocaína. Cuando la cocaína se hierve con agua se produce una hidrólisis parcial dando como producto benzoil-ecgonina y metanol



La hidrólisis ácida de la cocaína se produce cuando ésta se hierve con agua más ácido clorhídrico o ácido sulfúrico diluido o agua de barita, dando como productos cantidades equimolares de metanol, ácido benzoico y la base llamada ecgonina.

En la figura 10. Se encuentra la obtención de BE partiendo de Cocaína.

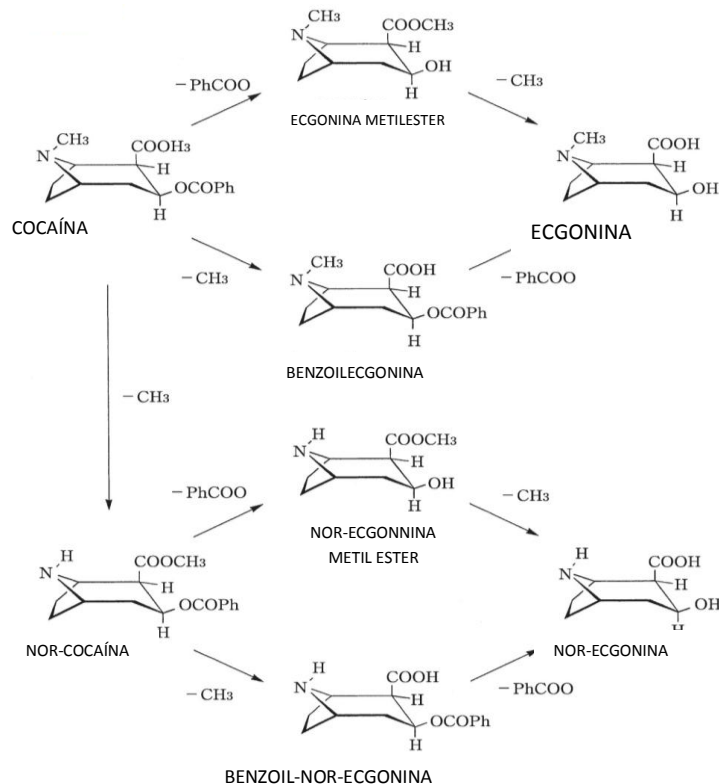


Fig. 10. Cocaína y sus metabolitos

Propiedades

La benzoilecgonina cristaliza con 4 moléculas de agua, en forma de prismas triméricos parecidos al del oxalato de amonio, el cual funde en rangos de temperatura variables de 87°-140°C. Su rotación específica es 63,3°. Es parcialmente soluble en agua fría, pero fácilmente soluble en agua caliente, alcohol, álcalis diluidos y ácidos; es casi insoluble en éter. Cuando se calienta con álcalis o ácido clorhídrico a 100°C, se descompone en ácido benzoico y ecgonina.

1.2.2.3. Cannabinoides^{15,16}

La Cannabis Sativa es una planta anual perteneciente al género de las moráceas, pero que, en algunas ocasiones, junto con el lúpulo se la ha considerado como de la familia de las cannabáceas.

Las variaciones ambientales modifican la proporción de componentes psicoactivos presentes en la Cannabis Sativa entre los que destaca el Δ9-tetrahidrocannabinol (THC). Se han identificado en la planta más de cuatrocientos compuestos químicos, entre los que unos sesenta constituyen el grupo químico de los cannabinoides, al que pertenece el THC. La caracterización de su estructura química ha permitido el diseño en el laboratorio de análogos que han sido de gran utilidad en el estudio fisiológico y farmacológico de estos compuestos. Las sucesivas modificaciones de su estructura han llevado a la síntesis de derivados relacionados con alguna de las acciones farmacológicas atribuidas a los cannabinoides, evitando sus efectos psicotrópicos.

Existen diversas vías para la entrada de los cannabinoides al organismo, que influyen sobre el grado de absorción y la velocidad de difusión. Dado su marcado carácter hidrófobo, se almacenan en el tejido adiposo y solo una mínima proporción tiene acceso directo al cerebro. Su lenta liberación desde este tejido prolonga su presencia en sangre y su actuación sobre el organismo durante varios días.

La actuación de cada uno de los cannabinoides sobre el organismo puede modificarse por los otros compuestos que lo acompañan en dependencia del tipo de preparado de la Cannabis Sativa consumido. Las interacciones entre estos compuestos pueden ser de tipo sinérgico, aditivo o antagónico.

Los cannabinoides son aquellas sustancias que tienen una estructura carbocíclica con 21 carbonos y entre los que se incluyen sus análogos y los productos procedentes de su transformación. Están formados generalmente por tres anillos, ciclohexano, tetrahidropirano y benceno, como se muestra en la figura 11.

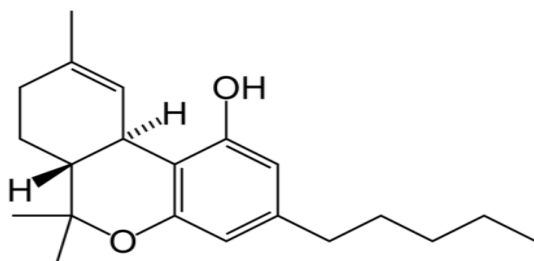


Fig. 11 Estructura Δ^9 -THC

Desde un punto de vista químico se han definido 3 tipos de plantas, en dependencia de la concentración de los principales cannabinoides:

1) Tipo droga pura con un alto contenido en THC (2-6%) y que carece de CBD: corresponde a las plantas que crecen en climas cálidos como México o Suráfrica.

2) Tipo intermedio, en el que las concentraciones de THC son más bajas y tiene ya algo de CBD: corresponde a plantas que crecen en climas cálidos, alrededor del Mediterráneo como Marruecos o Líbano.

3) Tipo fibra, en el que el contenido en THC es muy bajo (<0.25%) y el de CBD es superior al 0,5%: corresponde a plantas que crecen en climas templados como Francia o Hungría.

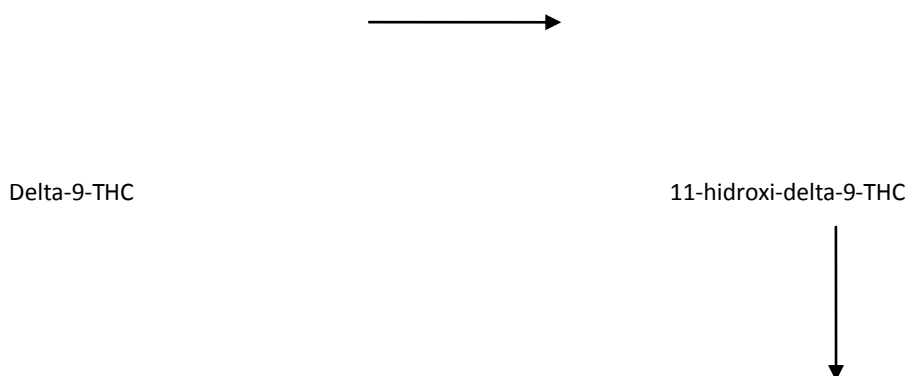
El resto de los cannabinoides naturales pueden presentar características estructurales comunes. Así, el Δ^9 -tetrahidrocannabivarol (Δ^9 -THCV), cannabidivarol (CDBV) y cannabivarol (CBNV), solo se diferencian del THC, CBD y CBN, respectivamente, en que tienen como cadena lateral propilo en vez de pentilo. Esta cadena puede ser también un n-butilo o un metilo. En el segundo caso se encuentra la serie de los cannaborcinol. Otros cannabinoides presentes en la planta son el cannabiciol (CBL), el cannabigerol (CBG) y el monometiléter del cannabigerol (CBGM), cannabielsoina (CBE), cannabinodiol (CBND), cannabitriol (CBT), dehidrocannabifurano,

cannabicitrano, cannabiripsol que aparecen en cantidades diferentes según la variedad de Cannabis Sativa valorada.

En la planta, los cannabinoides pueden contener un grupo carboxilo, en posición 3' o 5' del anillo de benceno. Estos compuestos son muy inestables y sufren una descarboxilación espontánea, transformándose en los correspondientes cannabinoides neutros. El ácido cannabidiolico, que tiene actividad antibiótica, es un constituyente importante del cáñamo del tipo fibra. Este compuesto aparece en las etapas iniciales del desarrollo de la planta y aumenta su presencia en las etapas finales de la maduración. La mayor parte de los componentes no cannábicos, hidrocarburos, terpenos, azúcares y aminoácidos, son los constituyentes normales de una planta por lo que no es de esperar que contribuyan al perfil farmacológico específico de la droga.

El Δ^9 -THC es un cannabinoide con mayor potencia psicoactiva, por lo que estas propiedades en una muestra de cannabis dependerán de su contenido en este compuesto. El Δ^9 -THC presenta propiedades hidrófobas por lo que es muy soluble en lípidos. Esto le confiere unas características, en relación con su distribución en el organismo y con su eliminación, que le diferencian de otras drogas de abuso. Es bastante inestable, pudiendo ser degradado por el calor, la luz, los ácidos y el oxígeno atmosférico, lo que podría explicar la pérdida de potencia que se produce durante su almacenamiento.

Solo una mínima cantidad de éste compuesto es eliminada del cuerpo en su forma original, mientras que la mayor parte aparece en forma de metabolitos en orina (12%). La droga está también presente en otros tejidos y fluidos biológicos como el sudor, pelo y saliva. En la figura 12 se muestra la biotransformación de Δ^9 -THC.



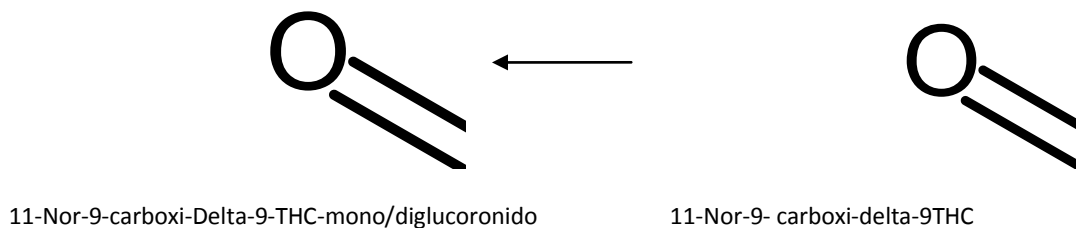


Fig. 12 Biotransformación Δ^9 -THC

1.2.2.3.1. 11 Nor-9 Hidroxi- Δ^9 -Tetrahidrocannabinol

El principal metabolito del delta-9-THC que circula a proteínas plasmáticas en un 99% es el 11-OH-Delta-9-THC. Este metabolito puede sufrir procesos de transformación como una segunda conjugación del 11-OH-Delta-9-THC con ácidos de cadena larga (oleico y esteárico).

Propiedades

El 11-OH-delta-9-THC se oxida a ácido carboxílico (Acido-delta-9-THC-11-oico) o puede volverse a hidroxilar a metabolitos más polares por rotura de cadena lateral y oxidación al correspondiente ácido carboxílico.

1.3. FLUIDOS BIOLÓGICOS

El movimiento de los fluidos es difícil de analizar, ya que puede presentar un flujo uniforme, flujo irrotacional o flujo no viscoso. El término de flujo uniforme se refiere a que todas las partículas llevan la misma velocidad al pasar por un punto; el flujo irrotacional significa que el fluido no tiene velocidad angular neta, y flujo no viscoso significa que la viscosidad es despreciable; la viscosidad se refiere a una fricción interna en el fluido.

Ahora bien, en el cuerpo humano el mantenimiento de un volumen de líquidos relativamente constante y de una composición estable de los líquidos corporales es esencial para tener una buena homeostasis, es decir un buen equilibrio.

Algunos de los problemas clínicos más importantes se deben a alteraciones en los sistemas que mantienen constante el nivel de los líquidos corporales. En un adulto normal el total de agua representa aproximadamente el 60% de su peso corporal, este porcentaje puede cambiar con la edad, sexo y grado de obesidad, ya que conforme aumenta la edad el porcentaje de líquido disminuye; esto se debe a que hay aumento del peso corporal por grasa, la cual disminuye el porcentaje de agua.

La importancia de analizar los diferentes tipos de fluidos biológicos en relación a la investigación radica en el aspecto toxicológico, el cual implica principalmente la identificación de diferentes sustancias, como es en este caso la identificación de Drogas de abuso las pueden llegar a ser Cocaína, Anfetaminas, Cannabinoides, entre otras. Es en esta parte donde se encuentra involucrada la química forense y el punto en donde el químico analista se encuentra con una dificultad debido a que la detección de Xenobióticos en matrices biológicas es una tarea difícil, no solo por que se necesitan equipos que son relativamente caros, si no debido a que la transformación parcial o total de los mismos en el organismo da lugar a la aparición de entidades químicas diferentes, lo que conlleva al desarrollo de técnicas de laboratorio lo suficientemente sensibles y específicas, contando a su vez con los patrones de referencia de las drogas y sus posibles metabolitos.

1.3.1. DEFINICIÓN¹⁷

Un fluido biológico se puede definir como toda secreción o líquido biológico, fisiológico o patológico que se produce en el organismo (sangre, heces, orina, expectoración, saliva, secreciones y pus entre otros).

Las muestras biológicas son muy complejas, en ellas el principio activo está presente en muy baja concentración, también están presentes los metabolitos y además puede haber compuestos interferentes.

1.3.2. TIPOS DE FLUIDOS

Los fluidos biológicos se pueden clasificar de acuerdo a su complejidad de contagio, es decir, a su grado de riesgo:

- Fluidos de alto riesgo
- Fluidos de bajo riesgo.

Fluidos de Alto Riesgo. Se aplican siempre a la sangre y a todos los fluidos que contengan sangre visible. Se incluyen además el semen y las secreciones vaginales, leche materna y aquellos líquidos provenientes de cavidades normalmente estériles como: líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido pericárdico y líquido amniótico, saliva en caso de procedimientos invasivos en cavidad bucal. Se considera de alto riesgo por constituir fuente de Infección de virus de hepatitis B, VIH y otros agentes que se transmiten por la vía parenteral.

Fluidos de Bajo Riesgo. Se aplican a las deposiciones, secreciones nasales, expectoración, transpiración, lágrimas, orina o vómitos a excepción de aquellos que tengan sangre visible.

De acuerdo a este tipo de clasificación algunos ejemplos de fluidos son:

- Saliva
- Sangre
- Orina
- Moco
- Mucosidades
- Líquido amniótico
- Líquido cefalorraquídeo
- Semen
- Líquido sinovial
- Líquidos serosos

Sangre. La sangre es un fluido que tiene un color rojo característico, debido a la presencia del pigmento hemoglobínico contenido en los eritrocitos.

Su función principal es la logística de distribución e integración sistémica, cuya contención en los vasos sanguíneos (espacio vascular) admite su distribución (circulación sanguínea) hacia casi todo el cuerpo.

El plasma sanguíneo. Es un fluido traslúcido y amarillento que representa la matriz extracelular líquida en la que están suspendidos los elementos formes.

Saliva. Contiene dos tipos principales de secreción proteica, una serosa rica en ptilina que digiere almidones y otra mucosa que contiene mucina que lubrica y cubre la superficie. El pH de la saliva es de 6 a 7. Una de sus funciones es ayudar a lavar y arrastrar los gérmenes patógenos y las partículas alimenticias; también destruir bacterias por medio de iones y enzimas.

Moco o mucosidades. Uno de los fluidos más conocidos es el moco, que consiste en una secreción densa compuesta fundamentalmente por agua, electrolitos y una mezcla de varias glucoproteínas formadas a su vez por polisacáridos unidos a cantidades por más menores de proteínas.

Líquido amniótico. El líquido amniótico es aquel que se encuentra en el útero alrededor del feto. Existe también una cierta absorción del líquido por el tubo digestivo y los pulmones del feto.

Líquido Cefalorraquídeo. El líquido cefalorraquídeo o cerebroespinal, conocido como LCR, es un líquido que baña el cerebro y la médula espinal. Circula por los ventrículos cerebrales y el canal medular central.

Semen. El semen es una secreción que llevan los espermatozoides suspendidos en el líquido seminal.

Líquido sinovial (articular). La membrana sinovial es la cubierta interna de las articulaciones sinoviales, la cual es segregado por la Sinovia que rodea la cápsula articular por su superficie interior.

Líquidos serosos. Los líquidos serosos se encuentran entre las membranas que recubren determinados órganos. Estas membranas se encuentran plegadas sobre sí mismas dejando una cavidad virtual que cuando se hinchan se forma una cavidad real. La hoja interna se llama hoja visceral y la lámina externa se llama hoja parietal.

1.3.3. ORINA^{16,17}

Es un líquido muy complejo, está compuesta de 95% de agua y 5% de sólidos. Es el producto final del metabolismo llevado a cabo por millones de células, del que resulta una eliminación urinaria promedio de 1 a 1 ½ litros por día, lo cual depende de la ingestión de líquidos. Una amplia variedad de productos de desechos formados en los procesos metabólicos del organismo son transportados hacia el exterior con la orina.

Las funciones de la orina influyen en la homeostasis como son:

- Eliminación de sustancias tóxicas producidas por el metabolismo celular como la urea.
- Eliminación de sustancias tóxicas como la ingesta de drogas.
- El control electrolítico, regulando la excreción de sodio y potasio principalmente.
- Regulación hídrica, para el control de la tensión arterial.
- Control del equilibrio ácido-base.

Composición

En la tabla 1.6 se encuentra expresada la composición química estándar de la orina excretada en 24 horas en una persona adulta.

Tabla 1.6. Composición química de la Orina

COMPONENTE	CANTIDAD
Acidez titulable	20-40 mEq/24 Horas
Ácido ascórbico	15-50 mg
Ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA)	2-9 mg
Ácido vanilmandélico (VMA)	0.7-6.8 mEq
Alfa amino nitrógeno	0.4- 1.0 g

Amilasa (Somogy)	35-260 U/h
Amino	30-50 mEq
Arsénico	0.05 mcg o menos
Bilirrubina	Ausente
Calcio dieta de 10 mEq ó 200 mg de calcio	< 7.5 mEq / 24 hrs ó <150 mg/24 hrs.
Catecolaminas	<100 mcg
Cetonas, total (media \pm 1 SD)	50.5 \pm 30.7 mg
Cuerpos cetónicos	Negativo
Creatinina, como creatinina	Hombres adultos < 50 mg Mujeres adultas <100 mg
Creatinina	1.0 – 1.6 g
Deshidrogenasa láctica	560-2.050 U/ 8 h de orina
Azufre	0.7-3.5 g
Excreción de D-Xilosa	5-8 g/h después de dosis oral de 25 g
Fósforo	0.6 1.2 g
Glucosa verdadera (método de la oxidasa)	50- 300 mg
Iodo	50-250 mcg
Magnesio	0.05-0.2 g
Plomo	< 0.08 mcq/ mL ó 120 mcq/24 h
Potasio	25-100 mEq (varía con la ingesta)
Cloruros	150-270 mEq ó 10-15 g
Proteínas	< 50 mg
Cobre	0-25 mcg
Sodio	100-260 mEq (varía con la ingesta)
Coproporfirinas (tipo I y II)	100-300 mcg
Tirosina	Ausente
Urea	20-25 g
Urobilinógeno	1-3.5 mg

Características

Apariencia. El aspecto es el termino general que se refiere a la transparencia de la muestra de orina. En un análisis de orina de rutina, el aspecto se determina mediante examen visual de la muestra mixta al sostenerla frente a una fuente de luz. La terminología empleada para informar el aspecto incluye transparente, ligeramente turbia, turbia y lechosa.

El aspecto normal de la orina fresca recién tomada es por lo general transparente; sin embargo, con frecuencia la turbidez causada por la precipitación de fosfatos y carbonatos amorfos se presenta como nubes blancas. La orina ácida normal también pueden tener aspecto turbio debido a la precipitación de uratos amorfos, oxalatos de calcio o cristales de ácido úrico.

Color. En la tabla 1.7 se muestran los diferentes colores que puede tener una muestra de orina así como sus causas y las correlaciones de laboratorio.

Tabla 1.7. Colores de las muestras de orina

Color	Causa	Correlaciones de laboratorio
-------	-------	------------------------------

Incolora Paja Amarilla pálida	Reciente ingestión de líquidos Poliuria o diabetes insípida Diabetes sacarina	Se observa con frecuencia en muestras al azar. Aumento de volumen de 24 horas. Densidad elevada y prueba de glucosa positiva.
Amarilla oscura Ámbar Anaranjada	Muestra concentrada Bilirrubina Acriflavina Zanahoria o vitamina A Pyridium Nitrofurantoína	Puede ser normal después de ejercicios energéticos o si es la primera muestra de la mañana. Deshidratación por fiebre o quemaduras. Espuma amarilla cuando se agita y pruebas químicas positivas para bilirrubina. Pruebas biliares negativas y posible fluorescencia verde Soluble en éter de petróleo. Fármaco administrado con frecuencia en infecciones de vías urinarias. Puede tener espuma anaranjada que puede dificultar o interferir con las lecturas de las tiras. Antibiótico administrado para infecciones de vías urinarias.
Amarilla verde Amarilla parda	Bilirrubina oxidada a biliverdina Ruibarbo	Espuma de color en orina ácida, pruebas químicas negativas falsas para bilirrubina. Se observa en orina acida.
Verde Azul Verde	Infección por Pseudónimas Amitricina Metocarbamol Clorets Indicán Azul de metileno Fenol	Cultivo de orina positivo. Antidepresivos. Relajante muscular. Ninguna. Confirmar con la prueba Obermayer. Ninguna. Cuando se oxida.
Rosa Roja	Eritrocitos Hemoglobina Mioglobina Porfirinas Betabeles Fenolsulfonftaleína Bromosulfaleína Ruibarbo Contaminacion menstrual Fenindiona	Orina turbia con pruebas químicas positivas para sangre, eritrocitos visibles al microscopio Orina transparente con pruebas químicas positivas para sangre; el plasma puede estar rojo. Orina transparente con pruebas químicas positivas para sangre; plasma incoloro. Existen pruebas específicas de identificación Pruebas químicas negativas para sangre. Detectar con prueba de Watson-Schwartz o fluorescencia bajo luz ultravioleta. Orina alcalina de personas genéticamente susceptibles. Orina alcalina después de la prueba PSP de función renal. Orina alcalina después de la pruebas PSP de función Hepática. Se observa en orina alcalina. Muestra turbia con eritrocitos, moco y coágulos. Anticongelante.
Parda Negra	Eritrocitos oxidados a metahemoglobina Acido homogentísico	Se observa en la orina acida después de un periodo; pruebas químicas de sangre positivas. Pruebas químicas para sangre positiva.

(alcaptonuria) Melanina o melanógeno Derivados del fenol Argyrol (antiséptico) Metildopa levodopa Metronidazol	Se observa en orina alcalina después de que se deja reposar; existen pruebas específicas. La orina se oscurece con el tiempo y reacciona con el nitroprusiato y cloruro férrico. Interfiere con las pruebas de reducción del cobre. El color desaparece con el cloruro férrico. Antihipertensivo. Flagyl, se oscurece con el tiempo.
---	---

El color de la orina varía desde casi incoloro hasta negro. Estas variaciones se pueden deber a funciones metabólicas normales, actividad física, sustancias ingeridas o trastornos.

Las descripciones comunes incluyen amarillo pálido, paja, amarillo claro, amarillo oscuro y ámbar. El color amarillo de la orina se debe a un pigmento (urocromo), el cual es un producto del metabolismo endógeno, y bajo condiciones normales se produce una tasa constante. También se eleva el urocromo en la orina que permanece a temperatura ambiente.

La orina amarillo oscuro o ámbar no siempre significa una orina concentrada normal y puede ser causada por la presencia del pigmento anormal bilirrubina.

Turbidez. Aparte de los cristales amorfos, las cuatro sustancias mas comunes que causan turbidez en la orina son los leucocitos, eritrocitos, células epiteliales y bacterias. Otras causas de turbidez incluyen lípidos, suero, moco, líquido linfático, cristales, levaduras, material fecal y contaminación. Muchas de estas sustancias no son patógenas; sin embargo, ya que los leucocitos, eritrocitos y las bacterias indican patogenicidad. Las causas dudosas de turbidez urinaria se pueden confirmar mediante las pruebas químicas sencillas mostradas en la tabla 1.8.

Tabla 1.8. Pruebas químicas realizadas a Orina

Correlaciones de laboratorio de la turbidez urinaria
<p>Orina acida uratos amorfos. Medio de contraste radiográfico.</p>
<p>Orina alcalina Fosfatos amorfos, carbonatos.</p>
<p>Soluble con calor Uratos amorfos, cristales de ácido úrico.</p>
<p>Soluble en ácido acético diluido</p> <p>Eritrocitos. Fosfatos amorfos, carbonatos.</p>
<p>Insoluble en ácido acético diluido Leucocitos. Bacterias, levaduras.</p>

Espermatozoides.

Soluble en éter

Líquidos.

Líquidos linfáticos, quilo.

Densidad. La densidad se define como la gravedad específica de una sustancia comparada con la de un volumen similar de agua destilada a una temperatura similar. Ya que la orina es en realidad agua que contiene sustancias químicas disueltas, la densidad de la orina es una medida de la gravedad específica de las sustancias químicas disueltas en la muestra. Por ser una medida de la densidad de la muestra, en ella influyen no solo el número de partículas presentes sino también su tamaño. Las grandes moléculas de urea contribuyen más a la lectura que las pequeñas moléculas de sodio y cloruro.

Sin embargo se debe descartar aquellas muestras que presenten una densidad mayor a 1,030 debido a que probablemente esas muestras se encuentran diluidas.

En la tabla 1.9. se encuentran descritas las propiedades generales de la orina.

Tabla 1.9. Propiedades de la orina

Propiedades	Concentración
Color	Ambar
Ph	4.8 a 7.4
Residuo seco	55-70 g en las 24 hs
Volumen	Mayores de 15 años , 1000 a 1600 mL en 24 horas

Ventajas. La orina, a diferencia del plasma, es por lo general libre de proteína y lípidos, siendo ésta una característica favorable para ser extraído directamente con un solvente orgánico y el tiempo de vida de las drogas es mayor y contiene alta concentración de metabolitos fácilmente detectables.

La orina tiene sin embargo, una variación extensa en composición. La composición general de la orina depende en su mayoría por la dieta y esto puede dar razón de un alcance muy sorprendente de colores.

Afortunadamente el tipo normal de compuesto encontrado en orina es soluble en agua mientras que la mayoría de drogas son liposolubles y pueden ser extraídas con un solvente apropiado. Una de las máximas dificultades que se presenta, sin embargo, es debida a las grandes diferencias en el volumen de orina que pueden producirse durante los espacios fijos de tiempo.

La orina es propensa para una gran variedad de pH, lo cual depende en gran medida de la dieta, o medicación. La variedad normal de pH es de 5.5 a 7. La naturaleza de la droga excretada bien podría depender del pH a la hora del análisis, en orina alcalina la concentración de droga puede llegar a ser más baja. La orina que se almacena, lentamente perderá dióxido de carbono y se pondrá más alcalina, dando como resultado la precipitación de fosfatos inorgánicos. Así la orina

fresca tendrá una composición diferente para orina almacenada y los efectos matriciales así como también la estabilidad real de droga en muestras almacenadas irá cambiando.

Problemas Especiales Con Fluidos Biológicos En La Determinación De Drogas^{15, 16,17, 18}

De manera básica, el análisis de drogas consiste en presentar la muestra a un aparato de medición y recibir las respuestas en base a que es y la cantidad de ésta. Sin embargo, un fluido biológico no es un compuesto simple, sino uno muy complicado conteniendo una multitud de componentes que sutilmente pueden reaccionar uno con otro y por lo tanto contribuya a algún tipo de interferencia con la parte final, quizá enmascarándola, o alterando los valores reales por degradaciones (pH, enzimas).

Los fluidos biológicos que son más comúnmente analizados son sangre, plasma y orina. La sangre entera es una de las menos analizadas, sin embargo existen pocas técnicas analíticas que son suficientemente específicas para poder separar la droga en el fluido directamente, el primer problema es aislar la droga de todo el material endógeno que sea posible.

Manejo De Fluidos Biológicos^{17, 18,19}

Los laboratorios clínicos utilizan sistemas de transporte de muestras por diferentes motivos: el más común es por haber creado una red de módulos de obtención de muestras con el objetivo de acercar el servicio sanitario al usuario. También como resultado de la racionalización de este servicio. Otro motivo es por la existencia de hallazgos inusuales que hay que confirmar y también para colaborar en proyectos de investigación.

Es necesario garantizar una buena calidad en la fase pre analítica que incluye la preparación y obtención de las muestras. En caso contrario, no serviría de nada la inversión de recursos durante las fases analíticas y post-analíticas. Garantizar la calidad de la fase pre analítica es mucho más difícil de conseguir, ya que en esta fase hay una serie de factores que la dificultan considerablemente. Intervienen en la misma muchas personas que, a veces, son ajenas al laboratorio y también algunos procedimientos que se hacen fuera del laboratorio y son difíciles de controlar.

El transporte de las muestras desde el módulo hasta el laboratorio clínico procesador tiene que regirse por una normativa técnica que garantice la estabilidad de las propiedades biológicas.

Independientemente del medio de transporte, es necesario que los sistemas y las empresas de transporte estén autorizados en función de los tipos de materiales a transportar.

Todo el personal que participa en los diferentes procesos referidos al transporte tiene que disponer de la formación, habilidades y experiencia para ejecutar las actividades requeridas. También hay que asegurar que sean conscientes de la relevancia e importancia de sus actividades y sepan que contribuyen a la obtención de los objetivos de la calidad.

En definitiva, tenemos que considerar que todos los implicados en la fase pre analítica tienen que participar y trabajar conjuntamente para conseguir los objetivos de la calidad.

Consideraciones Jurídicas.

Los reglamentos a los cuales está sometido el transporte de muestras de diagnóstico están incluidos en normas internacionales muy generales que afectan a todo tipo de mercancías que tengan que transportarse. La interpretación y clasificación de estos reglamentos se refiere al transporte de mercancías peligrosas. Todos están basados en la normativa de las Naciones Unidas, de la que la Organización Mundial de la Salud (OMS) es consultora.

Tiene que destacarse que, en ocasiones, las muestras biológicas pueden incluir productos con agentes patógenos, ya que no puede tenerse la certeza de que no contengan microorganismos patógenos de algún tipo. Este es el motivo por el cual, cuando se habla de transporte, se consideran como mercancías peligrosas.

Para ello se recomienda:

- Usar guantes nuevos, gorro, tapabocas y no hablar nunca encima de las muestras.
- Limpiar todo el material que se reutiliza durante la toma de muestras (pinzas, guantes, bisturí, etc.) con alcohol antiséptico.
- Empaquetar las muestras siempre en material limpio o estéril.

Cadena De Custodia

La cadena de custodia es el proceso que sigue el indicio desde el lugar de la toma hasta la presencia de un juez, pasando por el laboratorio clínico, garantizando la integridad de la muestra, donde cada paso ha sido documentado y vigilado; la documentación prevé evidencia de la integridad de la muestra identificando las actividades relacionadas a la muestra y los individuos responsables.

Tres grupos manejan las muestras:

- Sitio de recolección.
- Transporte.
- Laboratorio analítico.

Cada una cuenta con características especialmente diseñadas con la finalidad de satisfacer las necesidades de los laboratorios especializados en el monitoreo de drogas. Cualquier cadena de custodia debe reflejar las necesidades del programa y proveer documentación completa fácilmente.

Adecuación De Muestras Para Su Recolección

Las muestras deben ser recolectadas en las instalaciones del empleador en un sitio de recolección especificado o fuera de las instalaciones del empleador, tal como una clínica de medicina ocupacional.

En el sitio de la recolección es responsable de:

- Recolectar.

- Etiquetar.
- Empacar.
- Embarcar.

Identificación De Las Muestras

Revisar los procedimientos de manejo de muestras. El laboratorio asignará un número a la muestra. Este número será utilizado para identificar y dar seguimiento a la muestra dentro del laboratorio. Por tal motivo se deben colocar los números de tal manera que permanezcan asegurados al contenedor y registrarlos en una bitácora.

Etiquetado

Colocar las etiquetas al contenedor y no a la tapa. Esto ayudará a evitar intercambios entre las muestras o sus etiquetas de identificación. Las etiquetas deben tener la siguiente información:

- Nombre e identificación del sitio de recolección.
- Fecha y hora de la recolección.
- Nombre o identificación del sujeto.
- Iniciales del sujeto como reconocimiento que la muestra es suya.
- Número de registro para ligar la muestra a la facturación.
- Volumen aproximado de orina recolectada.
- Nombre e identificación del sujeto.

Control De La Integridad De La Muestra

1. Observación. Algunos protocolos de recolección requieren que ésta sea entregada con un testigo presente. Este es un aspecto muy sensible que a menudo provoca respuesta emocional y no se recomienda generalmente en la mayoría de los casos.
2. Volumen. El volumen mínimo aceptable debe ser claramente específico. Esto puede depender del método de análisis tanto para el examen presuntivo como para la prueba confirmatoria. Usualmente, se requieren aproximadamente 20 mL.
3. Análisis de la integridad de la muestra. Se pueden realizar cuatro simples pruebas para evaluar la integridad de la muestra:
 - *pH*. El pH de la orina es una prueba del contenido de acidez de la orina. El pH de la orina es de entre 4 y 8. Si está fuera del rango especificado, éste puede indicar algún desvarío.
 - *Temperatura*. Una orina recién recolectada tiene una temperatura de 37°C. Una muestra falsa o adulterada con agua fría puede tener una temperatura menor.
 - *Gravedad específica*. Mide el total de sólidos contenidos en la orina. La adición de químicos o de agua puede alterar drásticamente este valor. Una muestra aceptable debe tener una gravedad específica de alrededor de 1.010. El rango posible de la orina es 1.002 a 1.030.
 - *Apariencia*: La orina debe tener un color de pálido a amarillo oscuro y una apariencia ligeramente turbia cuando se agita.

Después De La Recolección

Después de la recolección de la muestra, la orina debe ser transferida a un contenedor permanente para su almacenamiento y transporte. El contenedor debe de:

- Ser identificado con una etiqueta.
- Identificado por el sujeto.
- Sellado con cinta de seguridad y colocada en una bolsa o caja de seguridad y esta debe ser acompañada por el formato de cadena de custodia.

Seguridad

La seguridad en el sitio de recolección es un aspecto de gran importancia para obtener un resultado válido.

- Almacenar los componentes, etiquetas y empaques de transporte en un área segura. Si los contenedores de recolección son fáciles de obtener, se vuelve fácil el cambio de muestras.
- No permitir que el donador tenga alguna influencia en la etiquetación, empaque o envío de la muestra.
- Después de la recolección, almacenar las muestras en un refrigerador con cerradura en área de seguridad.

Empaque

Existen varios tipos de empaques disponibles para asegurar la muestra y proveer medios prácticos para el transporte al laboratorio.

- Algunas veces se utilizan cajas para almacenar y transportar las muestras. Usualmente se incluyen material aislante para prevenir fugas.
- Si no se requiere paquetería, frecuentemente se utilizan bolsas plásticas para las muestras y la documentación acompañante.
- Todas las muestras y contenedores de envío deben contar con sellos de seguridad y documentos de cadena de custodia.

Adecuación de las muestras para su transporte y procesamientos de manipulación.

El laboratorio clínico procesador debe disponer de un protocolo sobre la correcta conservación y transporte de las muestras, desde el momento de su obtención hasta su recepción en el laboratorio de análisis. Las personas responsables de su transporte tienen que seguir las instrucciones de trabajo correspondientes con el fin de conservar las características originales de las muestras diagnósticas. Debe tenerse presente que estas características dependerán del tipo de muestra, del constituyente y de su concentración.

Las muestras diagnósticas tienen que transportarse respetando la normativa vigente, tanto si el transporte se realiza con medios propios o subcontratados.

Trazabilidad de las muestras y de la documentación. Tiene que describirse la manera en la cual se mantenga la identificación y asociación inequívoca de las muestras y sus correspondientes peticiones durante el transporte, suministrando el material y los medios necesarios para garantizar la mencionada asociación.

Variables que influyen en la estabilidad. Tiene que definirse y controlar aquellas variables que puedan influir en la estabilidad de las muestras diagnósticas como pueden ser:

- *Agitación de la muestra.* Tiene que evitarse tanto como sea posible que durante el transporte las muestras estén sometidas a movimientos bruscos que las deterioren.
- *Exposición a la luz.* Es importante impedir la exposición de las muestras a la luz, ya que hay propiedades fotosensibles en la luz artificial y en la del sol.
- *Orientación del recipiente primario.* Para evitar el derramamiento de la muestra es recomendable que el recipiente primario esté en posición vertical.
- *Presión atmosférica.* En caso de transporte aéreo, las muestras tienen que prepararse para que resistan posibles cambios de presión.
- *Temperatura.* El transporte tiene que asegurar la temperatura de conservación de las muestras. Según su naturaleza, así como la de los constituyentes a analizar, la conservación y transporte requerirá que estén congeladas, refrigeradas a temperatura ambiente o en otro intervalo de temperatura.
- *Tiempo de transporte.* Las muestras tienen que transportarse al laboratorio lo antes posible, con el fin de minimizar el tiempo transcurrido desde la obtención hasta su recepción. Este tiempo dependerá del constituyente a examinar.

Tienen que quedar perfectamente especificadas las responsabilidades de cada variable y pueden estar especificadas en protocolos, documentos del sistema de gestión de la calidad de laboratorio clínico procesador o pliegos de condiciones de los contratos.

Embalaje y etiquetado. Para el transporte de las muestras de diagnóstico, el paquete a transportar tiene que cumplir una serie de requisitos en relación al etiquetado o su señalización, dependiendo de si el transporte se hace por vía terrestre o aérea.

Los embalajes destinados a las muestras de diagnóstico pueden constar de tres elementos:

- a) Recipiente primario: Los de polipropileno o polietileno son los más apropiados para la mayoría de aplicaciones. No se recomienda el cristal, a menos que se tenga cuidado para evitar la ruptura. Los recipientes tienen que estar diseñados para evitar el derramamiento.

Tiene que transportarse en posición vertical siempre que se pueda y ser herméticos. El recipiente tiene que tener una identificación inequívoca.

- b) Recipiente Secundario: Tiene que ser hermético y tiene que tener material absorbente entre él y el recipiente en cantidad suficiente para absorber todo el líquido en caso de derramamiento. Si no hay recipiente tercero, el recipiente de protección tiene que llevar una etiqueta con la frase "muestra de diagnóstico" y el resto de pictogramas reglamentarios según lo que contenga el paquete.
- c) Recipiente Terciario: Tiene que ser resistente a rupturas y golpes. El uso del recipiente terciario estará en función de las exigencias normativas de cada tipo de transporte (terrestre, aéreo, postal o marítimo). Tiene que llevar una etiqueta en la que figuren las direcciones del remitente y del laboratorio destinatario, así como otra con la frase "muestra de diagnóstico". Si se trata de una caja, serán necesarias dos etiquetas de orientación, colocadas en lados opuestos del paquete indicando su correcta posición.

También será necesaria una etiqueta que especifique la temperatura de conservación que requiere el paquete de no ser la temperatura ambiente.

En caso de utilizarse hielo carbónico, se colocará por fuera de los recipientes secundarios y terciarios permitiendo la huida del dióxido carbónico.

Cuando se tenga constancia de que se trate de una materia infecciosa, llevará el emblema de producto biológico infeccioso.

En los casos en que lleve hielo o nitrógeno líquido, tendrá que incorporarse también una etiqueta específica.

Transporte de muestras de diagnostico

El transporte de las muestras tiene que tener como prioridad preservar su integridad con la finalidad de mantener la estabilidad de las propiedades biológicas que las componen.

El transporte de muestras, de acuerdo con la titularidad de la empresa que lo realice, puede dividirse en:

- Transporte propio del laboratorio clínico procesador.
- Transporte subcontratado.

Condiciones del transporte para garantizar la calidad de las muestras

Un laboratorio clínico procesador tiene que tener un sistema fiable y bien documentado sobre transporte, con el fin de garantizar la calidad de las muestras que recibe o que envía.

Las personas que desarrollan las tareas de manipulación y transporte de muestras diagnósticas y agentes etiológicos tienen que adoptar procedimientos destinados a conservar sus características originales.

Teniendo en cuenta que el transporte de muestras puede comportar un riesgo para su calidad, hay que definir las condiciones que se requieren con el fin de mantenerla.

Requisitos técnicos dependientes del tipo de muestra (orina)

Tanto las pautas de recogida como su transporte desde su origen hasta el laboratorio son importantes, ya que las decisiones diagnósticas y terapéuticas pueden basarse en los resultados de los análisis obtenidos.

En general, las muestras de orina tienen que ser transportadas lo antes posible al laboratorio, a poder ser dentro de las dos horas de su obtención; si no puede evitarse el retraso de más de dos horas, la muestra se refrigerará.

Hay que considerar que hay diferentes tipos de muestras de orina:

- a) Orina de micción única: Es una muestra reciente, si no se mantiene refrigerado no es aceptable para un análisis microbiológico.
- b) Orina de 24 horas: En cuanto a su conservación y transporte hay importantes discrepancias según el metabolito a determinar. Hay diferentes temperaturas y agentes conservantes. Se debe evitar la exposición de muestras de orina a la luz cuando el metabolito a determinar sea fotosensible a la luz artificial y la del sol (Ultravioleta). Estas muestras tienen que estar protegidas con papel de aluminio o similar.

Examen microbiológico de orina: Si se solicita un examen microbiológico y la orina no puede ser transportada inmediatamente al laboratorio, tienen que realizarse los pasos siguientes:

1. La orina puede mantenerse refrigerada y hasta 24 horas puede proporcionar una información válida para su cultivo.
2. Puede transferirse una alícuota de la orina a un tubo de transporte que contenga un conservante bacteriostático. Estas muestras no requieren refrigeración.

Procedimiento de recepción de las muestras

El laboratorio clínico procesador tiene que aplicar los procedimientos necesarios para preservar la calidad y la inalterabilidad de las muestras, desde el momento de su llegada a la recepción.

Al llegar las muestras al laboratorio, se tienen que clasificar y preparar para ser centrifugada si así lo requieren.

Las muestras que llegan refrigeradas tienen que mantenerse a esta temperatura hasta el momento de ser centrifugadas.

El laboratorio clínico procesador de las muestras tiene que disponer de un listado que defina unos criterios de aceptación que permitan rechazar la muestra cuando estos no se cumplan:

- Identificación inequívoca de la muestra.
- Tiempo de transporte. Hay que disponer de registros procedentes del módulo de obtención donde estén indicados el día y la hora y la hora de la obtención de las muestras y de otro registro que contenga el día y la hora de la llegada al laboratorio clínico. Estos dos datos permitirán aceptar o rechazar las muestras, de acuerdo con el tiempo considerado adecuado.
- Registro de identificación de datos del personal implicado en el transporte:
 1. Identificación de la persona de cada módulo que entrega las muestras, así como la fecha y la hora que lo hace.
 2. Identificación de las personas o empresas implicadas en el transporte y entrega de las muestras.
 3. Identificación de la persona que las recibe en el laboratorio receptor.
- Verificar la integridad de la muestra.
- Comprobar que la temperatura de transporte de las muestras se ha mantenido de acuerdo con las condiciones preestablecidas.

- Comprobar las incidencias especificadas en las hojas de incidencias, la del módulo de obtención y la transportista.

Si alguno de estos criterios no se cumple, el laboratorio clínico receptor tiene que informar inmediatamente al módulo de obtención de muestras que lo ha enviado o dirigirse con la empresa transportista, según la naturaleza de la incidencia.

Métodos de adulteración

Existen varios factores que afectan la validez de la prueba durante la recolección. Debido a que muchos problemas son debido a la adulteración consciente por el individuo examinado, se debe estar al tanto de todas las posibilidades y tomar las precauciones necesarias en el sitio de recolección para evitarlo.

a) Adición de químicos.

Se puede adicionar químicos comunes (p.ej. cloruro de sodio) a la muestra. Una gran cantidad de químicos pueden ser agregados para adulterar la muestra, el efecto que pueda tener sobre los resultados puede ser muy variado y dependerá de la sustancia agregada, de la técnica utilizada y de los metabolitos a analizar. En la tabla 1.10 se representan algunos químicos comúnmente utilizados y su efecto sobre las diferentes técnicas en la detección de un metabolito específico.

Tabla.1.10. Principales adulterantes

Adulterantes	Cocaína	Cannabinoides
Amonio		+R
Ascorbato		M
Blanqueador		-E, -F
Detergente	+F	
Drano*	-R, -E, -F	-R, -E
Golden sal**		-R,-E
Jabón de manos		-R, -E
Fosfato		-R
Sal (NaCl)	-E	-E
Vanish***		-R
Vinagre		-E, -F
Visine****		-R, -E

*Gel removedor (destapador de tuberías)

** Botón de oro o hidrastate (fármaco utilizado para la congestión e inflamación de las vías respiratorias y estimulante del sistema inmunológico)

- *** Removedor de manchas multiusos en polvo (contiene oxígeno activo)
- **** Gotas lubricantes para ojos (descongestionante oftálmico)
- R: RIA (radioinmunoensayo)
- E: EMIT (Inmunoensayo múltiple enzimático)
- F: FPIA (Inmunoensayo de polarización de fluorescencia)
 - Reduce la positividad
 - + Aumenta la positividad

Tratamiento de muestras biológicas en la determinación de drogas.

El análisis de las drogas se lleva a cabo en diferentes muestras, y de acuerdo a la naturaleza de las mismas se pueden distinguir dos tipos:

- Medicamentos: Donde el principio activo se encuentra en minoría frente a los excipientes.
- Muestras biológicas: Donde los analitos y sus metabolitos que suelen encontrarse en cantidades traza en comparación con el resto de los compuestos.

En todo tipo de fluidos biológicos, los analitos son componentes minoritarios que se encuentran junto a otros componentes complejos mayoritarios, por lo que, generalmente es necesario llevar a cabo un pre-tratamiento de la muestra.

Dicho tratamiento, en ocasiones incluye no sólo una separación de los compuestos mayoritarios que puedan suponer una interferencia, sino también una etapa de concentración antes de la etapa de análisis, que permitirá la cuantificación de dicha droga.

En esta primera etapa se suelen emplear dos técnicas de extracción:

a) Extracción líquido-líquido. Las drogas se separan de la muestra mediante el reparto entre dos solventes inmiscibles, a menudo mediante un ajuste de pH para controlar la ionización y una re-extracción a diferente pH para mejorar la selectividad y recuperación.

b) Extracción sólido-líquido. El principio de la extracción en fase sólida es similar a la extracción líquido-líquido e implica la partición de los compuestos entre una fase sólida y una líquida. El compuesto a extraer debe tener una mayor afinidad por la fase sólida que el resto de la matriz y ser fácilmente eluido posteriormente con un pequeño volumen de disolvente.

Los principios activos en muestras biológicas se pueden encontrar como tal, o como metabolitos. Muchas drogas y sus metabolitos pueden tener gran afinidad por las proteínas, mientras que la mayoría de conjugados de estas drogas son altamente hidrofílicos y, por lo tanto, difícil de extraer con disolventes orgánicos.

El pre-tratamiento de la muestra incluye tres pasos: la hidrólisis de las drogas conjugadas, la ruptura de unión con proteínas y, finalmente, la extracción.

Hidrólisis ácida y enzimática de los conjugados de la droga. La hidrólisis convencional se lleva a cabo con HCl bajo condiciones rigurosas que, a veces, causan la descomposición de otros compuestos generando una mezcla turbia. También es posible realizar la hidrólisis utilizando enzimas.

Separación de las proteínas (eliminación de las proteínas). Si los analitos tienen una elevada capacidad para unirse a las proteínas, el protocolo adoptado para eliminar dichas proteínas debe ser capaz de liberar estos analitos de las proteínas de manera que no se puedan perder.

La eliminación de las proteínas puede llevarse a cabo mediante el uso de:

- a) Temperaturas extremas, fuerzas iónicas o condiciones de pH.
- b) Agentes precipitantes orgánicos.
- c) Enzimas proteolíticas.

Extracción. Los procedimientos de extracción utilizados dependerán del fin analítico y del tipo de técnica analítica seleccionada. Los dos procedimientos de extracción utilizados son la extracción líquido-líquido o extracción sólido-líquido.

Como hemos podido darnos cuenta el fluido biológico de elección para realizar las pruebas de detección del consumo de drogas ilícitas, es la orina debido a que esencialmente es una solución acuosa que constituye una vía de eliminación de productos de desecho metabólicos.

Por lo tanto, el adentrarnos en el terreno del análisis de las drogas ilícitas, no resultará una tarea sencilla, debido a la diversidad de estructuras químicas que se presentan en la orina y si además de esto añadimos que:

- Las drogas ilícitas al identificarse en este fluido biológico han sufrido en el organismo los normales procesos de biotransformación, a través de los cuales se producen metabolitos que, en ocasiones, presentan una estructura y por consiguiente unas propiedades químicas que difieren de la droga precursora ingerida.
- Muchas veces estas estructuras se encuentran en la orina e niveles de nanogramos, bien porque se hayan ingerido en dosis que se aproximan más a las terapéuticas que las sobredosis responsables de intoxicaciones, o bien porque los procesos de biotransformación hayan producido muchos metabolitos de los que sólo se puede identificar un mínimo porcentaje de entre los excretados.

En consecuencia, se ha de investigar y desarrollar la metodología más idónea para realizar el análisis de detección en el menor número posible de fracciones de orina, debido a que la cantidad disponible es escasa (alrededor de 25 a 30 mL) y hay que examinar en cada una de ellas las drogas o metabolitos químicamente similares; es decir, tratando de que las características bioquímicas comunes puedan convertirse en características analíticas comunes.

Sin embargo, en cualquier caso, para lograr reunir las características analíticas comunes, es necesario cumplir con condicionantes previas, siendo dos las de mayor importancia:

- Para dar inicio a la preparación de la muestra, una de las partes fundamentales es la adición a la orina de un estándar de referencia, con el fin de comprobar la correcta realización del proceso, verificar el funcionamiento de los instrumentos analíticos y lo más importante que sería identificar y cuantificar las sustancias previamente detectadas en el análisis preliminar. Como es lógico, este estándar interno no debe interferir en el proceso.
- Sin embargo, las drogas o metabolitos, se encuentran en dos formas básicas en la orina:

1. Las que aparecen sin modificación alguna; es decir, en forma libre y por lo tanto no requieren más que de un adecuado cambio de pH , cuyo objetivo es incrementar la solubilidad de la o las sustancias de interés en un disolvente para, posteriormente poder ser separadas del resto de los componentes de la orina.
2. No obstante, el resto de las drogas o sus metabolitos, se eliminan a través de la orina en forma conjugada, tras haber sufrido el correspondiente proceso de biotransformación. Por lo tanto es necesario no solo un cambio de pH, sino también un proceso de Hidrólisis.

La Hidrólisis se lleva a cabo por dos razones: en primer lugar, las drogas o sus metabolitos deben ser identificados como tales, por lo cual las sustancias conjugadas han de separarse mediante la hidrólisis con el fin de aislar la posible sustancia presente en la orina; por otra parte, la identificación de moléculas con un alto peso molecular exige una analítica que es menos compleja cuando esas moléculas se transforman en otras de inferior peso molecular mediante un proceso de hidrólisis.

En función de diversas condicionantes, se puede seleccionar entre una hidrólisis ácida o enzimática; siendo estas dos modalidades las más frecuentemente empleadas. En el caso de la hidrólisis enzimática, ésta se lleva a cabo a temperaturas poco elevadas, empleando como reactivos enzimas, tales como la β -glucuronidasa; sin embargo, la hidrólisis ácida, genera una reacción más violenta que la enzimática y se realiza a altas temperaturas y en menor tiempo, lo cual es una de las ventajas de esta última modalidad.

Una vez que se cumple con cualquier de los anteriores condicionantes, la orina ha de prepararse para el análisis confirmatorio por cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de masas propiamente dicho mediante procesos de extracción y derivatización.

EXTRACCIÓN

El proceso preanalítico de extracción podría definirse como un procedimiento de purificación de la muestra. Debido que al poner una muestra en contacto con un disolvente orgánico en el que solo sean solubles las sustancias que se van a identificar, únicamente éstas pasan al disolvente, mientras que las restantes quedan en la fase acuosa. Por ello, el disolvente más adecuado será aquel que permita extraer el mayor número posible de drogas y más metabolitos y el mínimo de componentes interferentes.

En el laboratorio pueden efectuarse:

- Extracción líquido-líquido, a través de la cual entran directamente en contacto dos fases líquidas: La muestra y el disolvente, con el objeto de separar uno o más componentes de una disolución normalmente acuosa mediante un disolvente inmiscible, generalmente orgánico que se pone en contacto con la orina. El disolvente se elige considerando diversos factores, principalmente el grado de solubilidad tanto de la sustancia que se desea extraer como de los restantes componentes de la disolución, en este tipo de extracción se utiliza agitación mecánica, con el fin de incrementar la transferencia de la sustancias presentes en la muestra al disolvente;

posteriormente se realiza una centrifugación para lograr la separación de la fase orgánica, y así lograr aislar el extracto.

Los disolventes comúnmente empleados son:

- Cloroformo/Isopropanol.
 - Cloroformo/Éter etílico.
 - Éter etílico/Acetato de etilo.
- Extracción sólido-líquido, sirve para separar los componentes de una mezcla basándose en los diferentes grados de adsorción, absorción, intercambio iónico, etc. que presentan sobre un determinado sólido con el que se ponen en contacto, de forma que al pasar la muestra, en el sólido quedan retenidas las sustancias que se desean extraer. Este sólido ha de poseer unas características especiales, siendo las resinas en sus diferentes clases, los sólidos más utilizados. En este caso la muestra acuosa y el disolvente se hacen pasar por una resina, que es seleccionada de acuerdo con las características químicas de la sustancia que se desea extraer.

Al respecto existen en el mercado diversos tipos de resinas o cartuchos de extracción que deben ser seleccionados tomando en cuenta las características químicas de la o las sustancias que se desean aislar.

Una vez que se ha seleccionado y realizado la extracción de los compuestos de interés, es conveniente realizar la reducción del volumen del extracto hasta sequedad, lo anterior con el objeto de aumentar la concentración de las sustancias que serán identificadas o para poder acceder a la siguiente etapa que sería la derivatización.

En la etapa de derivatización es conveniente que no existan residuos de agua que muchas veces reaccionan con el derivatizante y nos quita abundancia en nuestros resultados cromatográficos.

DERIVATIZACIÓN

Los métodos de derivatización analítica constituyen un alto porcentaje de los procesos de preparación de muestras para análisis químico; se practican habitualmente en diversas áreas científicas, entre ellas el control de detección de drogas ilícitas en fluidos biológicos. De forma muy simple, se puede considerar como objetivo prioritario de las reacciones de derivatización la formación de moléculas volátiles y estables, derivadas de aquellas otras que, por ser difícilmente evaporadas o por descomponerse con facilidad, son deficientemente detectables por métodos cromatográficos.

Desde el punto de vista del control analítico de detección de drogas ilícitas en fluidos biológicos, los derivados se forman para:

- Mejorar la detección por cromatografía de gases mediante.
 - El aumento de la estabilidad térmica.

- La mejoría de la respuesta, al disminuir los fenómenos de adsorción a través de la columna, reduciéndose en consecuencia la formación de “colas” en los picos cromatográficos.
- La mejoría de la separación cromatográfica en mezclas de sustancias similares.
- Un incremento del factor de respuesta en el detector, mejorando incluso la sensibilidad de detección al utilizar detectores específicos.
- Modificar la fragmentación en una espectrometría de masas, es decir, obtener fragmentos diferentes que permitan confirmar una identificación previa de la sustancia que se deriva.

Para la preparación de derivados se utilizan reactivos de derivatización; por las características químicas de las drogas ilícitas, los derivados que se obtienen son principalmente trimetilsilil-derivados, aunque también se introducen grupos acetilo y halogenados.

1.4. MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE ESTABILIDAD ^{20,21}

Todos los compuestos extraños pueden ser determinados en matrices biológicas y no biológicas y de manera directa e indirecta. Por lo tanto tenemos cuatro modalidades de análisis en química forense que se puede resumir de la siguiente manera:

1- Análisis Directo en Fluidos Biológicos: Esta modalidad implica la aplicación de procedimientos de extracción y determinación específicas para una establecida sustancia que se quiere buscar y se lleva a cabo cuando los antecedentes del caso apuntan hacia la misma o si se quieren hacer determinaciones cuantitativas.

2- Análisis Indirecto en Fluidos Biológicos: Esta modalidad implica la aplicación de un " Screening " para descartar el mayor número de tóxicos posibles e incluir un número reducido de ellos, hasta lograr la identificación, pudiendo posteriormente aplicar una técnica directa para aumentar la eficiencia de los análisis. Este procedimiento de Screening puede variar algo dependiendo de la muestra biológica de que se trate.

3- Análisis Directo en muestras No Biológicas: Como en el primer caso la determinación se lleva a cabo mediante una técnica ya probada y utilizando como patrones de referencia las sustancias sospechosas, debido a que los antecedentes del caso así lo requieren.

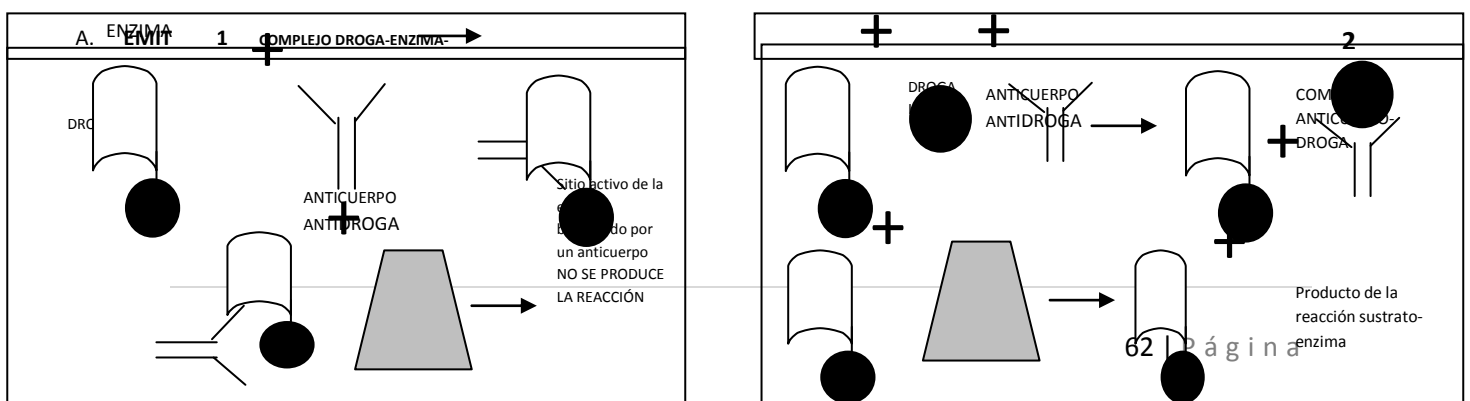
4- Análisis Indirecto en muestras No Biológicas: Como las muestras pueden ser tan disimiles, existen varios procedimientos de "Screenig" dependiendo del estado físico de la sustancia, solubilidad, y de la naturaleza químico-física de la muestra en cuestión.

El análisis de drogas en fluidos biológicos, independiente de la modalidad de los análisis, generalmente se tienen cinco pasos fundamentales, cuya comprensión es de extrema importancia para obtener buenos resultados, y cada uno de ellos representa prácticamente un campo dentro de la toxicología analítica:

Las técnicas utilizadas para la detección de la presencia y/o los niveles de determinadas drogas son de dos tipos principales inmunoquímicas y cromatografías.

1.4.1. MÉTODOS CUALITATIVOS^{18,20,21}

Actualmente la mayoría de las pruebas de drogas se llevan a cabo utilizando el denominado inmunoensayo homogéneo. El término homogéneo hace referencia al hecho de que estos ensayos se llevan a cabo en un solo paso (es decir, solo se utiliza un anticuerpo en el proceso). Esta tecnología ha revolucionado la toxicología ya que permite llevar a cabo de forma rápida un análisis de los constituyentes de sangre y orina. La técnica se muestra esquemáticamente en la figura 13-A. Se muestran dos tipos de ensayos. En el primero, la técnica inmunológica mediada por enzima o inmunoensayo por multiplicación de enzimas (EMIT), la droga se une covalentemente a una enzima como la fosfatasa alcalina. Cuando el complejo droga-enzima se incuba con un anticuerpo (generalmente monoclonal) contra la droga, la actividad de la enzima disminuye significativamente como resultado del bloqueo del sitio activo de la enzima por el anticuerpo. Cuando, como en la figura 13-A, la droga exógena (tal como se encuentra en suero) se añade al complejo inmune, esta droga exógena compite con el complejo droga-enzima por el anticuerpo. La liberación del complejo droga-enzima hace que aumente la actividad enzimática. Concentraciones crecientes de droga en suero dan lugar a un aumento de la actividad enzimática observada.



B.FPIA

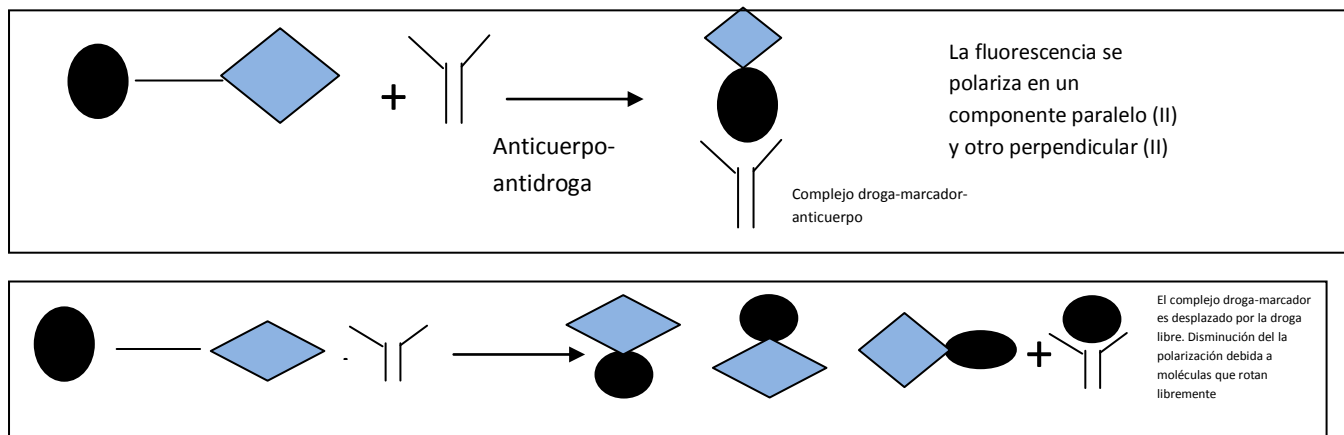


Fig. 13-A. Métodos homogéneos para la detección cualitativa o cuantitativa de los niveles de drogas en los fluidos corporales. A. En la técnica inmunológica mediada por enzima (EMIT) se utiliza como marcador un complejo droga-enzima. Cuando se une al anticuerpo antidroga, se bloquea el sitio activo de la enzima (unida a droga). En consecuencia, cuando se añade sustrato no se produce reacción, como se muestra en la parte 1. Sin embargo si, como ocurre en suero, hay droga libre presente, algunos (o la mayoría) de los complejos enzima-droga se separan de los anticuerpos antidroga. Ahora los sitios activos de los complejos enzima-droga liberados están libres y el sustrato sigue la reacción, como se indica en la parte 2B. En el método de polarización de la fluorescencia (FPIA), la aproximación general es la misma que en A salvo en que en este método la droga está unida a un marcador fluorescente. Cuando el complejo droga-marcador se une al anticuerpo antidroga, su fluorescencia se polariza en un componente paralelo y uno perpendicular. Cuando es desplazado por la droga libre, como la que se encuentra en suero u orina, el complejo droga-marcador es desplazado del anticuerpo antidroga, lo que da lugar a una disminución de la polarización de la fluorescencia

El inmunoensayo de polarización de la fluorescencia (FPIA) es el segundo tipo de ensayo homogéneo y se muestra en la figura 13-B. Este método es especialmente sencillo. En vez de unirse a la enzima, como en la figura 13-A la droga se une covalentemente a una molécula fluorescente. Si la molécula fluorescente se excita con la luz polarizada y es estacionaria (es decir, no rota en solución), emitirá luz fluorescente como un fluorómetro. Sin embargo, si el fluoróforo rota cuando está libre en la solución, perderá la polarización. No obstante, si el fluoróforo está unido a una macromolécula, la polarización es resistente, ya que al estar unidas a un anticuerpo que no rota, permanece relativamente estacionario. En estos ensayos, la droga unida al marcador se incubó con el anticuerpo. Pro supuesto, la polarización de la fluorescencia de la droga marcada es elevada, puesto que el marcador fluorescente está relativamente inmovilizado unido al anticuerpo contra él. Al añadir droga exógena, como la que se encuentra en suero, a la reacción se da lugar al

desplazamiento de algunas de las moléculas de droga, marcadas, como se muestra en la figura 13-B. Estas moléculas desplazadas pueden ahora rotar libremente en solución. Esto da lugar a una disminución de la polarización de la fluorescencia. Esta disminución está directamente relacionada con la concentración de la droga en suero.

Este ensayo puede detectar niveles de drogas del orden nanomolar y es muy sensible y específico.

En la tabla 1.11 se encuentran los niveles iniciales utilizados para cada uno de los metabolitos para determinar si son negativos o positivos presuntivamente, según FDA

Tabla 1.11. Cutoff para análisis de screening

Espécimen	(ng/mL)
Metabolito de Marihuana	50
Metabolito de Cocaína	300
Metabolito de Opioides	2000
Benciclidina	25
Anfetaminas	1000

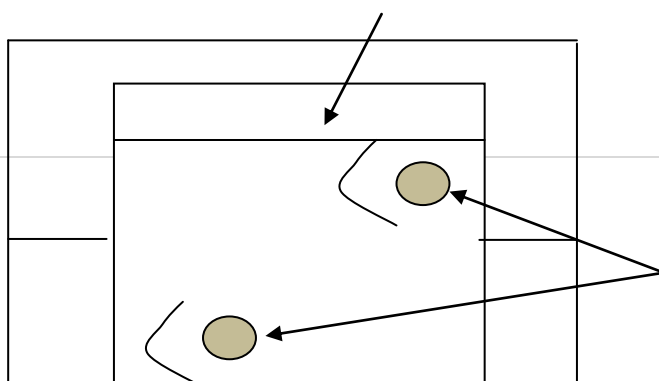
1.4.2. CUANTITATIVOS

Los procedimientos cromatográficos se han aplicado principalmente a la detección cualitativa de drogas y toxinas en menor medida, a la determinación de los niveles de fármacos. Los tres métodos más importantes son la cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases-espectrometría de masa (CG-MS). Aunque la GC-MS se considera el método de referencia para la detección y cuantificación de drogas volátiles y venenos, se están desarrollando nuevas técnicas analíticas como la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS).

Cromatografía de Capa Fina. Utilizando este método se pueden separar muchos compuestos según sus afinidades relativas por una fase polar estacionaria sólida (normalmente un silicato hidratado) y una fase móvil líquida no polar (como un 10% de metanol en cloroformo). Dependiendo de estas afinidades, los diferentes compuestos serán adsorbidos por el silicato hidratado en diferentes posiciones a medida que el solvente no polar migra a lo largo del silicato hidratado estacionario.

El principio se ilustra en la figura 14. Para un sistema disolvente determinado, el ratio de la distancia recorrida por el compuesto frente a la distancia recorrida por el frente de disolvente es constante para cada compuesto y puede usarse para identificar al compuesto en una mezcla. Este ratio se denomina *rf*. Esta técnica es de suma importancia para la identificación de drogas de abuso, que pueden separarse unas de otras por medio de la TLC.

Frente del disolvente en la tira de silicón



Puntos de migración; se muestran como distribuciones gaussianas de las muestras A y B

El estuche que recubre y asegura que la presión del vapor se mantenga constante

--- Disolvente

Puntos de aplicación de la muestra

Fig. 14. Ilustración del principio de la cromatografía de capa fina (TLC). Dos solutos A y B, se aplican a la tira polar de silicato. A es más polar que B y, por tanto, tiene más afinidad por la fase estacionaria polar que la fase móvil no polar (normalmente metanol en cloroformo). Más aún, esta afinidad relativa de A es mayor que la afinidad de B por la fase polar. En la tira, por lo tanto, A queda más cerca del punto de aplicación y B migra más.

Identificación de drogas específicas. Después de la separación de las drogas es necesario identificarlas. Este objetivo se logra sometiendo las drogas a reacciones colorimétricas estándar para cada compuesto. En este procedimiento, para drogas básicas, simplemente se sumerge la tira sucesivamente en tres disolventes diferentes, lo que produce como resultado patrones característicos de color para cada droga. La tira también se ilumina con luz ultravioleta (UV), lo que excita la fluorescencia determinados compuestos. Para las drogas ácidas extraídas en la tira B se utilizan procedimientos similares.

Cromatografía en fase líquida de alta resolución. La cromatografía de capa fina permite la detección cualitativa directa de drogas de forma panorámica. La HPLC permite la detección cuantitativa de drogas y una separación mas fina de las mismas. En la HPLC, la fase estacionaria, que puede ser bien polar o bien no polar, está compuesta en una cromatografía en fase invertida de partículas ultra finas y uniformes que aumentan enormemente su área de adsorción. Esta fase estacionaria se sitúa en una columna. La resistencia al flujo de esta columna es alta, de modo que se requieren presiones elevadas para desarrollar tasas de flujo constantemente razonables. En el instrumento de HPLC se ejerce una presión constante en la columna usando dos bombas que operan de forma que, mientras una se retira, la otra empuja. La elusión de la columna se monitoriza a través de varios detectores que van desde detectores multilongitud de onda UV a electrodos de potencial redox. La práctica habitual al llevar a cabo una HPLC cuantitativa es usar un control interno, es decir, un compuesto similar en estructura a las drogas de interés, que se añaden al espécimen a analizar en una concentración conocida. Sabiendo la cantidad de este marcador o control interno que se añade a la columna y la cantidad que se recupera en la elución se puede calcular el porcentaje de recuperación de la columna para este compuesto y, por extrapolación, para todas las drogas de interés cuyas concentraciones se están cuantificando. Por tanto, esta técnica se puede ajustar para las pérdidas debidas a la columna (además de las pérdidas ocasionadas por los procedimientos de extracción).

Cromatografía de gases-espectrometría de masas. El campo de las pruebas de drogas se ha convertido en una de las áreas de los laboratorios clínicos que se desarrollan más rápidamente, debido al uso tan extendido (y siempre creciente) de estas drogas entre amplios segmentos de la población activa. En vista de la necesidad creciente de exámenes habituales de búsqueda de drogas, se ha hecho necesario disponer de técnicas de referencia para confirmar los resultados obtenidos por métodos de búsqueda como el EMIT y la TLC.

La CG-MS ha demostrado ser ese método de referencia debido a su gran sensibilidad y a su fiabilidad. Esta metodología, como su nombre indica, incluye dos técnicas: la cromatografía de gases y la espectrometría de masas. En la primera, los compuestos se calientan directamente para que pasen a estado gaseoso o se derivan para hacerlos más lábiles y facilitar su paso al estado gaseoso por calentamiento. Entonces pasan por una columna que tiene la fase estacionaria, que a menudo es un líquido, generalmente un hidrocarburo o un derivado del aceite de silicona, que baña un soporte sólido de la columna y ofrece una amplia superficie de adsorción. La separación es en esencia igual que en la TLC, en la capacidad de cada compuesto de ser adsorbido por la fase estacionaria, lo que depende en parte de la solubilidad relativa de los compuestos en la fase gaseosa frente a la fase líquida. Normalmente, los compuestos que eluyen de la columna se pueden detectar por medio de técnicas convencionales, salvo que, una vez que los compuestos se encuentran en la fase gaseosa en la que son calentados, se puede aprovechar otra característica del sistema: la capacidad de los compuestos calentados a altas temperaturas de perder o ganar electrones.

A elevadas temperaturas, los electrones de alta energía de un compuesto (es decir, los de menor potencial de ionización) se pueden excitar, de modo que la molécula pierde los electrones y adquiere carga electrónica. Este proceso puede facilitarse por medio de técnicas como el bombardeo de electrones en cámaras especialmente diseñadas que crean directamente moléculas ionizadas. La mayoría de estas moléculas ionizadas son cationes simples. En general, diferentes moléculas ionizadas tienen diferentes tamaños y diferentes pesos moleculares. Estas moléculas ionizadas se descomponen en fragmentos característicos cuyos ratios respecto a otros y cuyas posiciones de migración relativa frente a las de otros compuestos también son constantes. Las moléculas ionizadas pasan entonces a través de un campo eléctrico generado por cuatro varillas sometidas a corrientes rápidamente alternantes, el denominado detector cuadripolar. Dependiendo de cómo se module el campo, solo ciertas moléculas ionizadas, con ratios masa/carga específicos, podrán pasar a través del campo hasta el detector. Por tanto, las moléculas ionizadas se pueden separar según su peso molecular ó más exactamente, según su ratio masa/carga.

La presencia de una molécula ionizada en la placa es detectada por un sistema detector multiplicador de carga. La técnica de la CG-MS se ha refinado enormemente. Cada molécula ionizada creada en la fase gaseosa puede sufrir cambios posteriores, como reacciones de eliminación de fragmentos de reordenación para rendir pequeños fragmentos que, a su vez, se ionizan y tienen patrones de descomposición característicos. Se han determinado los patrones de miles de compuestos, y la posición de la molécula ionizada original y de los fragmentos de descomposición producen una huella (fingerprint) única para cada compuesto. Estos patrones se almacenan en un ordenador, de modo que cuando se obtiene el patrón de un compuesto o grupo de compuestos desconocido, este patrón se compara con los almacenados para identificar el compuesto de interés. Esta metodología ha obtenido un gran éxito en la detección de cocaína y sus metabolitos, incluso en cantidades bajas, en los fluidos corporales. Puesto que una única especie molecular ionizada puede producir corrientes significativas en el detector, es posible detectar niveles muy bajos de drogas, lo que ha hecho de esta técnica el método de referencia y la mejor prueba confirmatoria disponible en este momento.

Cromatografía líquida-espectrometría de masas. Como se explicó, la GC-MS es el método de referencia para la identificación de compuestos volátiles. Los compuestos no volátiles, sin embargo, pueden identificarse utilizando la LC-MS. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la CG-MS, el acoplamiento de la CL y MS requiere elementos más sofisticados de acoplamiento entre los componentes de ambas. El elemento de acoplamiento debe volatilizar los compuestos no volátiles que se han separado en la CL, eliminar el disolvente líquido de la CL y corregir la incompatibilidad de tasas de flujo entre LC y MS.

Como ya se mencionó anteriormente, cada prueba confirmatoria de drogas proveerá un resultado cuantitativo, el cual debe encontrarse por debajo de los niveles establecidos en la tabla 1.11 aceptada por FDA, en la cual se muestran los cutoff para algunas drogas de abuso.

Tabla 1.12 Cutoff para análisis en muestras confirmatorias

Espécimen	(ng/mL)
Metabolito de Marihuana ¹	15
Metabolito de Cocaina ²	150
Opiacios	
Morfina	2,000
Codeína	2,000
6-Acetylmorfina	10
Benciclidina	25
Anfetaminas	500
Metanfetaminas	500

1. Delta-9-tetrahidrocanabinol-9-acido carboxílico.

2. Benzoilecgonina

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente los laboratorios de análisis clínico enfrentan un problema; ya que al incrementarse el consumo de sustancias tóxicas se presentan situaciones o conflictos de índole legal o personal y en muchas ocasiones es necesario un reanálisis o confirmación de muestras positivas a drogas después de un tiempo transcurrido de haber recibido las muestras.

Existen factores que pueden alterar o modificar los resultados de las muestras, como son el control de las condiciones de temperatura para su almacenamiento.

En estos laboratorios, hasta el momento no se cuenta con un acuerdo generalizado de cuáles son los factores, que afectan o alteran la estabilidad de las muestras de análisis positivas a drogas o sustancias tóxicas.

Se propone este estudio para conocer las condiciones de almacenamiento que pueden afectar a dichas muestras, éste se hará por fases donde se someterán las muestras obtenidas de orina dando positivo a dos metabolitos (benzoilecgonina y 11-hidroxi-delta-9-THC) en condiciones experimentales de tiempo y temperatura, donde se cuantificarán los efectos así como el grado en que es afectada la estabilidad; de esta manera se podrá proponer a los laboratorios clínicos encargados de realizar estos estudios, las condiciones óptimas para almacenar sus muestras y mantener su estabilidad.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la estabilidad de las muestras de orina positivas a metabolitos de drogas de abuso en determinados periodos de tiempo.

3.2. OBJETIVO PARTICULAR

Determinar la influencia de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la estabilidad de los principales metabolitos de las drogas Cocaína y Cannabinoides (Benzoilecgonina y 11-nor-9-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol, respectivamente).

4. HIPOTESIS

Una droga y sus metabolitos al eliminarse por orina mantendrá sus propiedades en esa matriz durante un determinado tiempo.

Cuando se almacenan las muestras a temperaturas por debajo de 0°C, el comportamiento de sus propiedades será más estable durante mayor tiempo; mientras que la conducta de las propiedades de las mismas muestras almacenadas a temperaturas por arriba de 0°C tenderán a ser menos estables durante el mismo tiempo.

5. DISEÑO DE EXPERIMENTAL

5.1. TIPO DE ESTUDIO

- Experimental
- Observacional
- Transversal

5.2. POBLACIÓN

Muestras de orina positivas a Cocaína y Cannabinoides.

5.3. CRITERIOS

5.3.1. INCLUSIÓN

- Muestras con resultado positivo en prueba presuntiva.

5.3.2. EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN

- Muestras con resultados negativos en prueba presuntiva.
- Muestras derramadas.
- Muestras con volumen menor a 15 mL.
- Muestras que no se encuentren en recipiente de plástico de polietileno.

5.3.3. LIMITACIONES

- El estudio se realizó en los laboratorios clínicos CARPERMOR pertenecientes al sector privado.
- La población en estudio fue reducida por pertenecer a un sector socioeconómico alto.
- Se requería una cierta cantidad de muestras con una misma fecha de recolección.

6. METODOLOGÍA

Se recolectaron cinco muestras de orina positivas a Benzoilecgonina y 11-nor-9-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol respectivamente, las cuales fueron identificadas de acuerdo a su metabolito.

Se verificó que las muestras fueran presuntamente positivas a través de un análisis cualitativo EMIT.

Posteriormente, cada muestra se dividió en dos partes iguales y se almacenaron en recipientes de plástico recolectores pertenecientes al mismo lote de fabricación, de tal manera que se obtuvieron 2 muestras por individuo, como se representa en el diagrama 6.1.

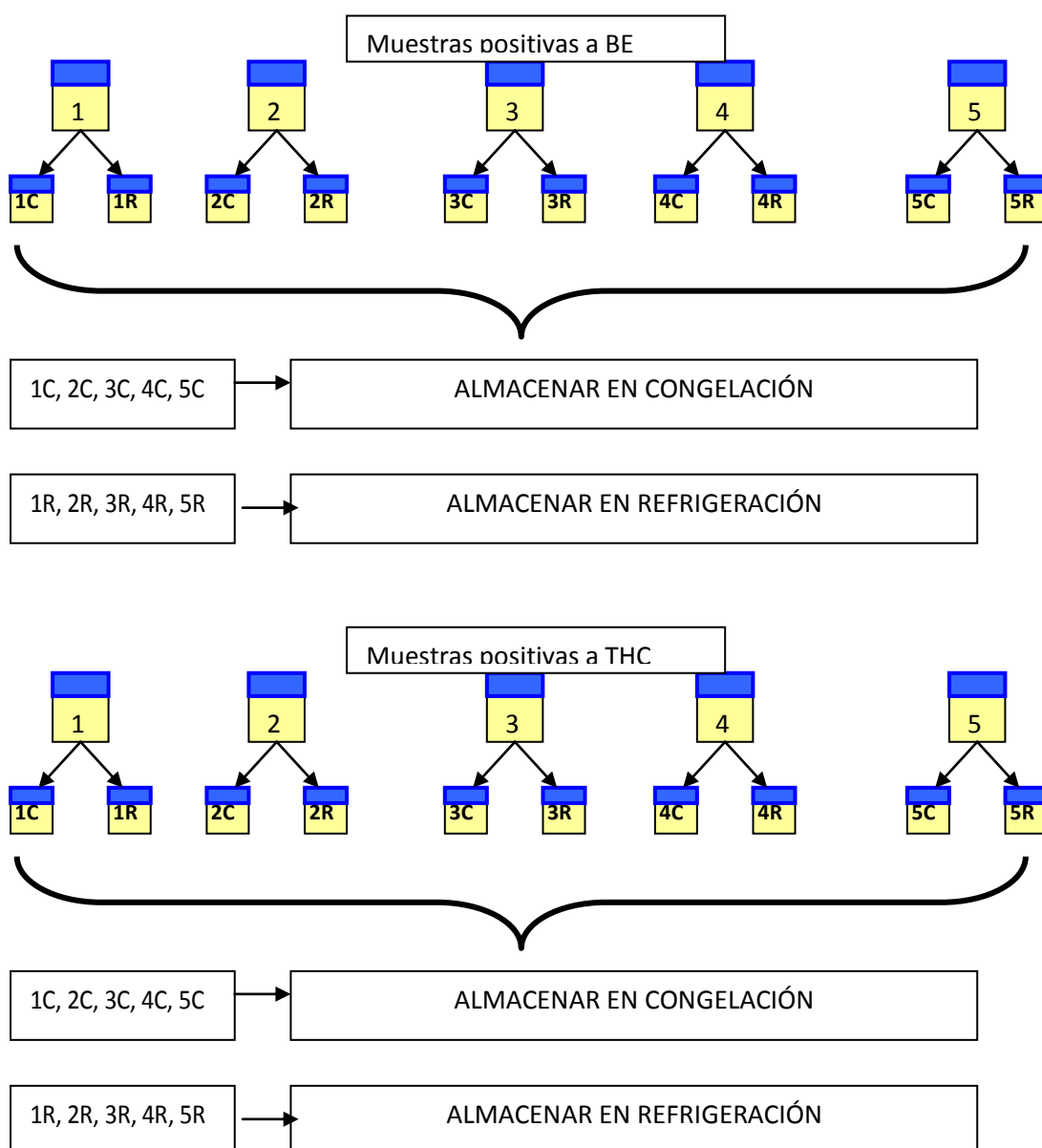


Diagrama 6.1. Clasificación y Manejo de Muestras

Las muestras recolectadas y aceptadas para el estudio se analizaron conforme los métodos abajo descritos pertenecientes a los laboratorios CARPERMOR y se almacenaron por individuo, una en congelación (-20°C) y otra en refrigeración (4°C) durante 6 meses.

Las muestras se analizaron cuantitativamente a los 0, 7, 15, 30, 90 y 180 días bajo las mismas condiciones de operación (equipo, instrumento y analista), 24 hrs antes de los días de análisis las muestras se sometieron a ciclos de congelado-descongelado. Se utilizaron soluciones de referencia recientemente preparadas en los días de análisis.

Método cualitativo

La medición cualitativa de la presencia del metabolito fue efectuada por un equipo analítico marca ARCHITEC que sigue la técnica EMIT. El equipo midió la concentración presuntiva de los metabolitos. Lo cual sirvió para determinar las diluciones que se emplearon para el análisis cuantitativo.

Método de cuantificación

La cuantificación de los metabolitos fue efectuado con el cromatógrafo de Gases habilitado con un detector selectivo de masas y un inyector. El cromatógrafo de gas midió los niveles de metabolito presentes en la muestras de orina.

Reactivos

Todos los productos químicos fueron grado analítico:

- Estándar interno de Benzoilecgonina-D₃ (5000ng/mL) marca Cerilliant
- Estándar interno de Benzoilecgonina (5000 ng/mL) marca Cerilliant
- Estándar interno de 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -THC (2000ng/mL) marca Cerilliant
- Estándar interno de 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -THC-D₃ (5000 ng/mL) marca Cerilliant
- NaHCO₃
- Cloroformo: isopropanol (80:20)
- Derivatizante BSTFA:TMCS (100:5)
- KOH
- Hexano: Acetato de etilo (85:15)

CANNABINOIDES

Estándar y preparación del Control

Se utilizó una muestra de orina negativa a 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -THC para generar los estándares y controles empleados en la determinación de éste metabolito.

Preparación de Control y Estándar.

Las soluciones estándar fueron preparadas para obtener concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 ng/mL.

Blanco Negativo. Se adicionó a 1 tubo de fondo cónico 2 mililitros de orina negativa y se siguió el mismo procedimiento de extracción de las muestras problemas.

Control negativo.

1. Se adicionó 1 mL de orina negativa a un matraz volumétrico de 2 mL.
2. Se agregaron 20 μ L del estándar de THC-D3 (5000ng/mL)
3. Se siguió el mismo procedimiento de extracción de las muestras.

Control Positivo (20 ng/mL)

1. Se adicionaron 1 mL de orina negativa a un matraz volumétrico de 2 mL.
2. Se agregaron 20 μ L del estándar de THC-D3 (5000ng/mL)
3. Se adicionaron 20 μ L del estándar de THC (2000 ng/mL) y aforaron con la misma muestra de orina negativa.
4. Se continuó el mismo procedimiento de extracción de las muestras.

Curva de Calibración (10, 20, 30, 40 y 50 ng/mL)

1. Se adicionaron a cinco matraces volumétricos de 2 mL, 1 mL de orina negativa.
2. Posteriormente se agregaron 20 μ L del estándar de THC-D3 (5000ng/mL), a cada uno.
3. Se adicionaron 10, 20, 30, 40 y 50 μ L del estándar de THC (2000 ng/mL), respectivamente y se aforó.
4. A continuación se siguió el mismo procedimiento de extracción de las muestras.

COCAÍNA

Estándar y preparación del Control

Se utilizó una muestra de orina negativa a Benzoilecgonina para generar los estándares y controles empleados en la determinación de éste metabolito.

Preparación de Control y Estándar.

Las soluciones estándar se emplearon para obtener concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 ng/mL.

Blanco Negativo.

A un tubo de fondo cónico se le agregaron 2 mililitros de orina negativa y se siguió el mismo procedimiento de extracción de las muestras problemas.

Control negativo.

1. Se adicionaron 1 mL de orina negativa a un matraz volumétrico de 2 mL.
2. Se agregaron 20 μ L del estándar de Benzoilecgonina-D3.
3. Se continuó el mismo procedimiento de extracción de las muestras.

Control Positivo (20 ng/mL)

1. Se Adicionaron 1 mL de orina negativa a un matraz volumétrico de 2 mL.
2. Se Agregaron 20 μ L del estándar de Benzoilecgonina-D3 (5000 ng/mL)
3. Se adicionaron 20 μ L del estándar de Benzoilecgonina (5000 ng/mL) y se aforó con la misma muestra de orina negativa.
4. Se siguió el mismo procedimiento de extracción de las muestras.

Curva de Calibración (10, 20, 30, 40 y 50 ng/mL)

1. A cinco matraces volumétricos de 2 mL, se les adicionó 1 mL de orina negativa
2. Se agregaron 20 μ L del estándar de Benzoilecgonina-D3 (5000ng/mL), a cada uno.
3. Se adicionaron 10, 20, 30, 40 y 50 μ L del estándar de Benzoilecgonina (5000 ng/mL), respectivamente y aforó.
4. Se continuó con el mismo procedimiento de extracción de las muestras.

Método

Los estándares positivos recién extraídos para calibrar los niveles de la curva de calibración fueron inyectados al cromatógrafo junto con un control positivo, un control negativo y un blanco cada día que el instrumento fue utilizado.

Método De Extracción

COCAÍNA

Previo a la extracción se determinó de manera preliminar la concentración de Benzoilecgonina de cada muestra problema usando el método EMIT.

Una vez determinada la concentración preliminar de las muestras problema, cada muestra fue tratada de la siguiente manera:

Se tomó un mililitro de orina problema, el cual se adicionó a un matraz volumétrico de 2 mL, seguido de la adición de 100µL del estándar de Benzoilecgonina-D3 y se aforó con la misma muestra; hubo tres muestras problemas que requirieron una dilución 1:2, dichas muestras se aforaron con agua destilada.

Una vez aforadas, todas las muestras se agitaron con ayuda de un vortex solo para homogeneizarla en un plazo de 15 segundos y los centrifugados fueron transferidos a tubos de fondo cónico.

Se ajustó el pH entre 8 y 9 mediante la adición de NaHCO_3 , se agitó hasta que se disolvió el bicarbonato completamente. Enseguida se agregaron 4 mL de cloroformo: isopropanol (80:20), se agitó durante 15 segundos en el vortex, a continuación se centrifugó la muestra durante 5 minutos a una velocidad de 3000 rpm, posteriormente se refrigeró durante 20 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo, se separó la fase acuosa de la fase orgánica utilizando una pipeta pasteur conectada a una bomba de vacío.

De la fase orgánica se tomó con ayuda de una pipeta volumétrica un mililitro de muestra y se traspasó a un vial de microreacción.

Con ayuda de una corriente de Nitrógeno en un baño de 40°C, se evaporó a sequedad las muestras y se terminó de secar en la estufa a 80°C durante 20 minutos.

Al término de este tiempo, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente

Una vez que se encuentran a temperatura ambiente, se derivatizaron con 40µL de BSTFA:TMCS agitando con el vortex, posteriormente se sometió a un baño de agua por espacio de 30 minutos a 60°C.

Por último, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inyectó en el CG/MS.

THC

Una vez determinada la concentración preliminar de las muestras problema, cada muestra fue tratada de la siguiente manera:

Un mL de orina problema se adicionó a un matraz volumétrico de 2 mL, seguido de la adición de 20µL del estándar de THC-D3 y se aforaron con la misma muestra.

Ya aforada la muestra, se agitó con un vortex solo para homogeneizarla por 15 segundos y el centrifugado fue transferido a un tubo de fondo cónico.

Se ajustó el pH a 12 mediante la adición de 0.5 mL de KOH 1N, se agitó durante 15 segundos y se verificó el pH usando el blanco negativo.

El tubo fue hidrolizado en un baño de agua a 55°C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se retiró el tubo del baño, se agitó en el vortex y enfrió a temperatura ambiente.

Se ajustó nuevamente el pH aproximadamente a 4 adicionando 0.3 mL de ácido acético y se agitó en el vortex durante 10 segundos. Una vez agitada la muestra, se agregaron 2 mL de Hexano: Acetato de Etilo (85:15), volviéndose a agitar durante un minuto. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos.

Una vez centrifugada la muestra, se recolectó en un tubo con tapón de rosca la fase orgánica. Se volvió a agregar 2 mL de Hexano: Acetato de Etilo (85:15), se agitó durante un minuto y de nueva cuenta se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos.

En el mismo tubo en donde se recolectó la primera fase orgánica, se adicionó la segunda fase orgánica y se agitó durante 5 segundos.

Un mililitro de la fase orgánica se tomó con una pipeta volumétrica y se traspasó a un vial de microreacción, el cual se evaporó a sequedad bajo corriente de Nitrógeno a 60°C y se terminó de secar en la estufa a 80°C durante 15 minutos y se deja enfriar a temperatura ambiente.

Por último, la muestra se derivatizó con 40µL de BSTFA:TMCS (100:5), por un espacio de 20 minutos a 60°C, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inyectó en el CG/MS.

Análisis

Los parámetros que debieron cumplir las muestras como material de análisis para la determinación de metabolitos se citan en las tablas 6.1 y 6.2, referentes a la apariencia y pH de orina.

Tabla 6.1 Rangos según apariencia de muestras de orina

Rango de especificación	Apariencia
+	Sin color o color amarillo claro
++	Turbia
+++	Lechosa
++++	Color amarillo naranja a marrón
+++++	Color rojo a marrón
++++++	Color marrón oscuro
+++++++	Color amarillo verdoso
+++++++	Color azul verdoso
+++++++	Rosada

Tabla 6.2 Especificación fisicoquímico de muestras de orina

Parámetro	Especificación
Ph	5-7
Densidad	≤ 1.030

Para la determinación de los factores que pudiesen afectar el estudio, se registraron los parámetros mencionados en la tabla 6.1 antes de realizar el análisis cuantitativo de los metabolitos, teniendo así resultados para cada uno de los tratamientos a los que fueron sometidas las muestras.

Las gráficas que se presentan dentro de los resultados del presente trabajo son un modelo del comportamiento en cada una de las etapas del estudio.

7. RESULTADOS

Los resultados y los análisis se dividieron en dos secciones:

- I. **Análisis Cualitativos.**
- II. **Análisis Cuantitativos.**

7.1. Análisis cualitativos

Debido a que es de principal importancia la naturaleza de la matriz para el análisis de los metabolitos; este fue el punto inicial de análisis donde se determinó la calidad con la que se mantienen las muestras antes de su análisis cuantitativo.

El estudio fisicoquímico se realizó antes de efectuar el análisis confirmatorio.

7.1.1. BENZOILECGONINA

En la tabla 7.1-A se muestran las medias de los resultados obtenidos en la condición de 4°C para el metabolito BE, mientras que en la tabla 7.1.-B se muestran las medias de los resultados obtenidos en la condición de -20°C. En el caso de la apariencia se midieron las muestras en base a la tabla 7.1 para ambas condiciones bajo estudio.

Tabla 7.1-A. Condición de análisis Benzoilecgonina Refrigerador 4°C

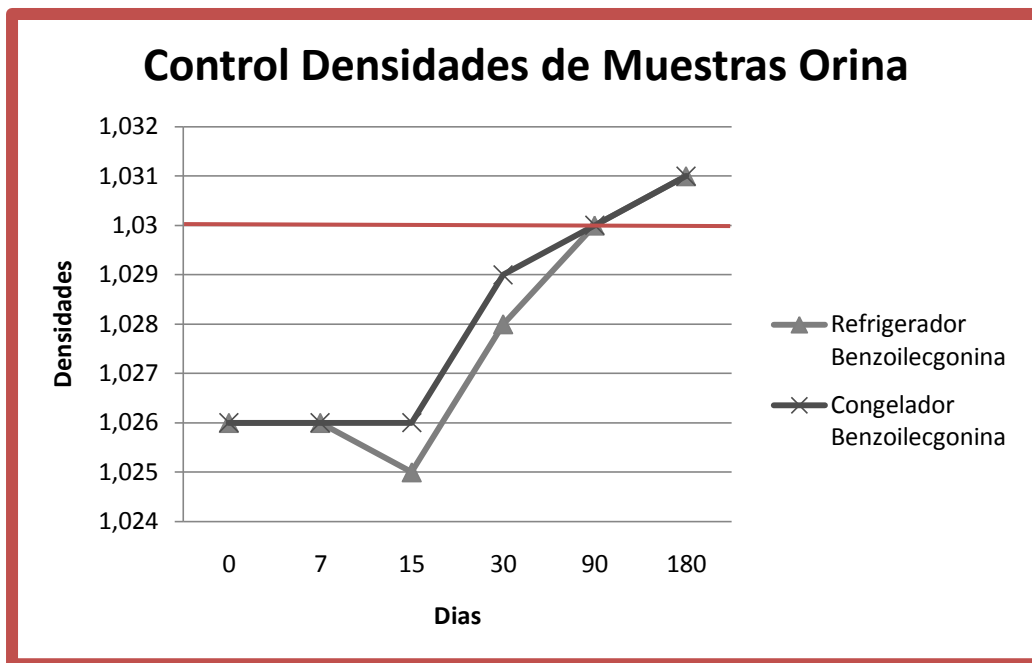
Parámetro	Inicial	DÍAS BAJO ESTUDIO				
		7	15	30	90	180
Apariencia	+	++	++	++	+++	+++
Ph	6,16	6.16	6.30	6,33	6,36	7,0
Densidad	1.026	1,026	1,025	1,028	1,030	1,031
Precipitado	Ausencia	Ligero precipitado	Ligero precipitado	Precipitado	Precipitado	Precipitado

Tabla 7.1-B Condición de análisis Benzoilecgonina congelador -20°C

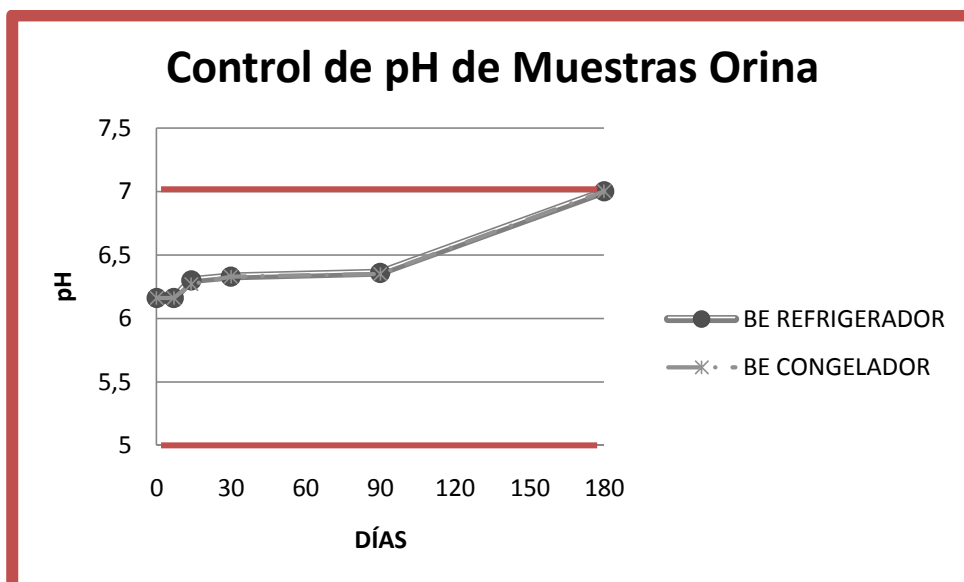
Parámetro	Inicial	DÍAS BAJO ESTUDIO				
		7	15	30	90	180
Apariencia	+	++	++	++	+++	+++
Ph	6,16	6.16	6.27	6,33	6,35	7,0
Densidad	1.026	1,026	1,026	1,029	1,030	1,031
Precipitado	Ausencia	Ligero precipitado	Ligero precipitado	Precipitado	Precipitado	Precipitado

Los resultados de las muestras fueron constantes; por tal motivo en las gráficas 7.1 y 7.2 se representa la media de los resultados obtenidos por fecha de análisis y por condición.

Gráfica 7.1 Densidades de Muestras de Orina para Benzoilecgonina.



Gráfica 7.2. Control de pH de muestras de Orina para el metabolito Benzoilecgonina



7.1.1.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS CUALITATIVOS PARA BE.

En los resultados obtenidos con respecto a la apariencia de todas las muestras urinarias de ambos grupos de almacenamiento, se observa que éstas, conforme transcurrió el tiempo fueron tornándose de color amarillo claro a turbio, hasta llegar a un color lechoso. Observándose este cambio más rápidamente en las muestras congeladas.

Esto se puede explicar porque la orina con valores de referencia aceptados se oscurece al dejarla estancada, lo cual es ocasionado por la oxidación del urobililogeno a urobilina, generado a partir de los 30 días.

En lo referente a los resultados en el pH se observa que éste, en las muestras con presencia del metabolito BE tanto refrigeradas como congeladas presentaron un comportamiento prácticamente igual, ya que ambas presentan un ligero aumento en la primera semana para posteriormente estabilizarse en un pH de 6,3 hasta el día 90, a continuación existe un incremento de aproximadamente 9 decimas hasta el día 180 cuando finalizó el estudio (Gráfica 7.2).

De acuerdo a las referencias bibliográficas consultadas, el pH de las muestras de orina estancada se torna alcalino debido a la pérdida de dióxido de carbono lo que a su vez ocasiona que la concentración del metabolito o la droga misma pueda llegar a ser baja. Produciendo que la estabilidad real del metabolito en muestras almacenadas vaya cambiando.

Analizando los resultados de la densidad se observa que todas las muestras permanecen estables con un valor de 1,025 los primeros 15 días, posterior a los cuales las muestras de BE en ambas condiciones (refrigeración y congelación) presentan un incremento ligero pero constante hasta llegar a un valor de 1,031 al finalizar el estudio (180 días).

Es importante resaltar con base en la literatura consultada que las muestras urinarias con una densidad relativa superior a 1,030 en reanálisis, cuando se emplea la técnica de densitometría no debería ser considerada para el estudio.

Esto debido a que el aumento de la densidad relativa urinaria es causado por la disolución de moléculas grandes y densas como las proteínas, carbohidratos y hemoglobina, lo cual pudiera en cierta forma afectar la estabilidad de la muestra.

Con respecto al precipitado urinario en todas las muestras, se observa que al inicio del estudio existe una ausencia total del mismo, presentando un ligero aumento hasta el día 30 posterior al cual existe una precipitación elevada en todas las muestras hasta el final del estudio. Esto se explica porque en las muestras urinarias que se mantienen estancadas, las sustancias excretadas naturalmente por el riñón, con el tiempo transcurrido y debido a su peso se precipitan, lo cual afecta a los resultados de densidad a partir del día 30 en el cual se muestra un aumento en ésta última.

Con todo lo anterior se observa que un análisis cualitativo para este metabolito puede ayudar a predecir la estabilidad de las muestras, en base a la densidad y el pH de las mismas, las cuales al no encontrarse dentro de los límites de referencia establecidos de acuerdo a la literatura consultada como lo marca la tabla 6.2.; los valores referentes a la concentración de droga o metabolito puede tener alteraciones ocasionadas por la degradación misma de la matriz.

7.1.2. 11-nor-9-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol

En la tabla 7.2-A se muestran las medias de los resultados obtenidos en la condición de 4°C para el metabolito THC, mientras que en la tabla 7.2-B se muestran las medias de los resultados obtenidos en la condición de -20°C. En el caso de la apariencia se midieron las muestras en base a la tabla 7.1 para ambas condiciones bajo estudio.

Tabla 7.2-A. Condición de análisis THC refrigeración 4°C

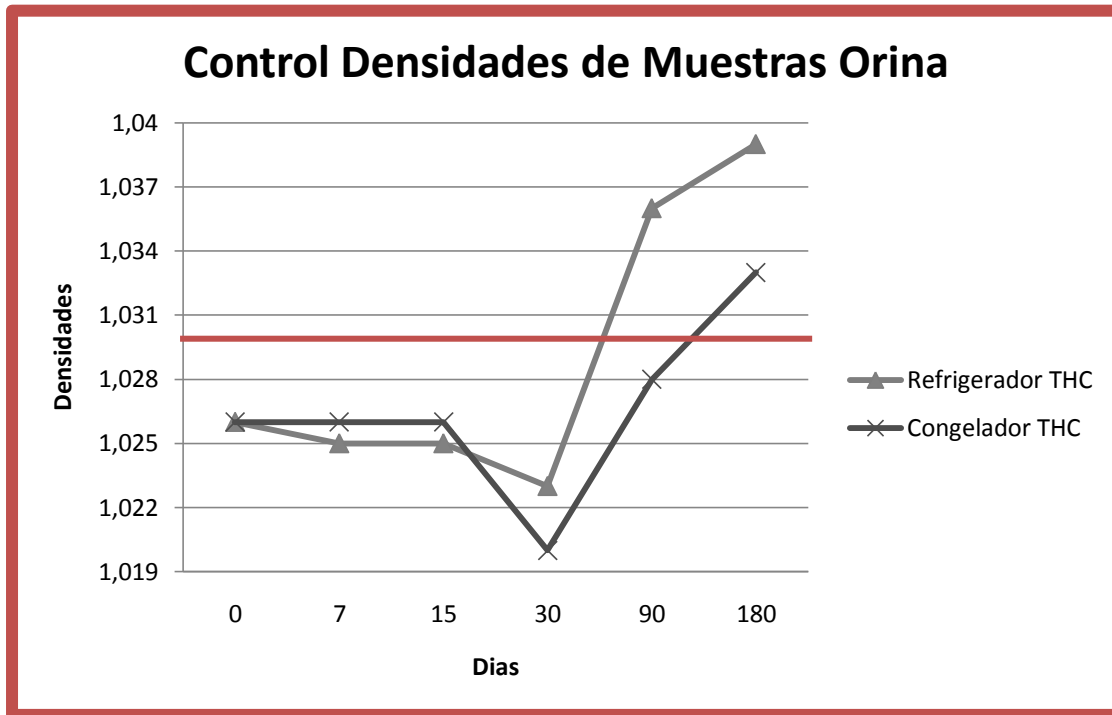
Parámetro	DÍAS BAJO ESTUDIO					
	Inicial	7	15	30	90	180
Apariencia	+	++	++	++	+++	+++
Ph	6,3	6,33	6,33	6,57	7,4	7,6
Densidad	1,026	1,025	1,025	1,027	1,036	1,039
Precipitado	Ausencia	Ligero precipitado	Ligero precipitado	Precipitado	Precipitado	Precipitado

Tabla 7.2-B. Condición de análisis THC congelador -20°C

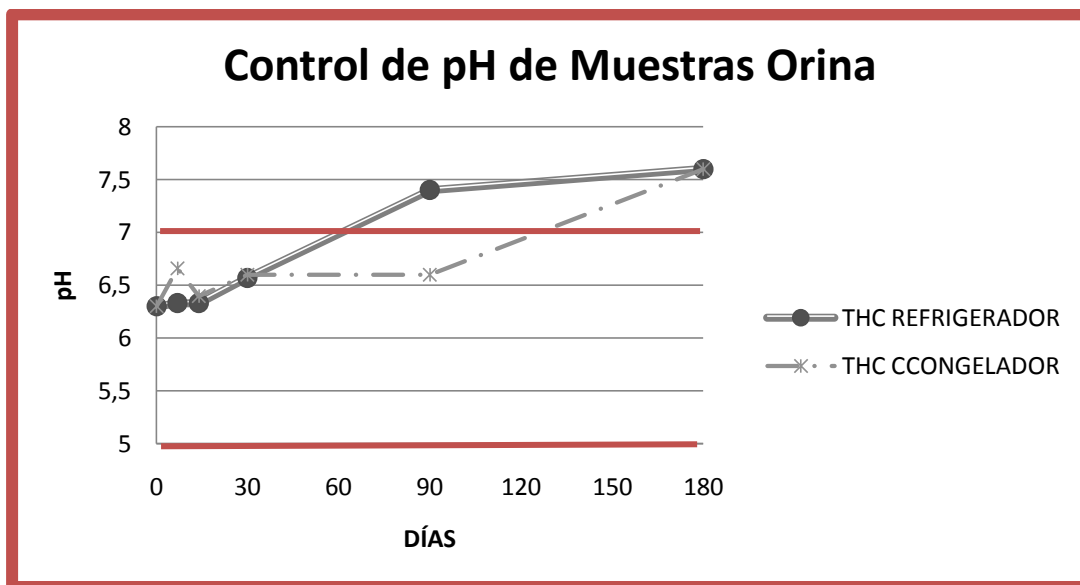
Parámetro	DÍAS BAJO ESTUDIO					
	Inicial	7	15	30	90	180
Apariencia	+	+	+	+	++	+++
Ph	6,33	6,33	6,4	6,6	6,6	7,6
Densidad	1,026	1,021	1,019	1,019	1,0288	1,033
Precipitado	Ausencia	Ligero precipitado	Ligero precipitado	Ligero Precipitado	Precipitado	Precipitado

Los resultados de las muestras fueron constantes; por tal motivo en las gráficas 7.3 y 7.4 se representa la media de los resultados obtenidos por fecha de análisis y por condición.

Gráfica 7.3 Densidades de Muestras de Orina para el metabolito THC.



Gráfica 7.4. Control de pH de muestras de Orina para THC.



7.1.2.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS CUALITATIVOS PARA THC

De igual manera que los resultados obtenidos con respecto al metabolito de BE, referentes a la apariencia se observa que las muestras de THC, conforme transcurrió el tiempo fueron tornándose de color amarillo claro a turbios, finalizando en un color lechoso. Observándose este cambio principalmente en las muestras refrigeradas.

En cuanto a los resultados en el pH las muestras del metabolito THC que se mantuvieron en congelación, presentaron en la primera semana un incremento rápido de 3 decimas regresando a la basal para volver a incrementarse tres decimas a los 30 días estabilizándose hasta el día 90, presentando nuevamente un incremento constante de prácticamente una unidad al final del estudio (180 días).

Por otra parte muestras refrigeradas de THC, en la primera semana permanecen estables pero a partir de los 14 días sufren un incremento constante hasta llegar a un pH de 7,3 en el día 90 se mantienen estables hasta finalizar el estudio llegando a un pH de 7,6.

Analizando los resultados de la densidad las muestras de THC presentan un decremento en ambas condiciones hasta el día 30, volviéndose a incrementar constantemente, para que al finalizar el estudio, las muestras congeladas presentaron una densidad de 1,032 aproximadamente y la muestra refrigerada un valor de 1,040 (gráficas 7.2).

Con respecto al precipitado urinario ocurre lo mismo que las muestras de BE, en donde se observa que al inicio del estudio existe una ausencia total del mismo, con un ligero aumento hasta el día 30 posterior al cual existe una precipitación elevada en todas las muestras hasta el final del estudio.

Las muestras de THC no presentan el mismo comportamiento en ambas condiciones, cuando se hace referencia al análisis de pH las muestras que se almacenaron a temperatura de 4°C no presentan variaciones en las mediciones es decir, su tendencia hacia la alcalinidad fue constante, no siendo así para aquellas que fueron congeladas.

Sin embargo, a pesar de que las muestras pertenecientes a refrigeración no presentaron fluctuaciones en los resultados, es decir, tanto su alcalinidad como el aumento de densidad fue constante, fueron éstas las que, comparando los resultados con los límites de referencia establecidos en la literatura consultada (tabla 6,2) son las que pueden presentar alteraciones ocasionadas por la degradación misma de la matriz a partir del día 30.

7.2. CUANTITATIVOS

Una vez concluida la parte analítica programada, los resultados obtenidos de las muestras de BE fueron separados en dos grupos de acuerdo a la concentración del metabolito presente en el análisis inicial.

El objetivo de la selección fue para poder evitar una interpretación errónea de los resultados.

7.2.1. BENZOILECGONINA

En las tablas 7.3-A, 7.3-B, 7.4-A y 7.4-B se muestran las concentraciones obtenidas a lo largo del estudio para los metabolitos BE, leídas en los tiempos programados y almacenadas en contenedores a las temperaturas de 4°C y -20°C; mientras que en las gráficas 7.5-A, 7.5-B, 7.6-A y 7.6-B se encuentran representados los resultados pertenecientes a dichas tablas (concentración de metabolito vs. Tiempo).

Tabla 7.3-A Concentración de BE grupo 1 (refrigeración 4°C)

BENZOILECGONINA GRUPO 1												
REFRIGERACION 4°C												
M	ANALISIS INICIAL		DIA 7		DIA 14		DIA 30		DIA 90		DIA 180	
	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%
1	2757,8	100	2269,4	82,29023	1795	65,0881	1727,1	62,62601	955,7	34,65443	0	0,0000
2	6974,5	100	5478	78,54326	4980	71,4030	4210,2	60,36562	353,8	5,07277	269	3,8569
3	10996,1	100	8626,1	78,44690	8600	78,2095	8585	78,07314	7908,5	71,92095	8017	72,9077
x	6909,4667	100	5457,833	79,7601	5125	71,5669	4840,7667	67,02159	3072,67	37,21605	356,9	25,5882

Tabla 7.3-B Concentración de BE grupo 1 (Congelación -20°C)

BENZOILECGONINA GRUPO 1												
CONGELACION -20°C												
M	ANALISIS INICIAL		DIA 7		DIA 14		DIA 30		DIA 90		DIA 180	
	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%
1	2757,8	100	687	61,17	620,4	58,75	1555,6	56,40	213,4	7,73	0	0,0
2	6974,5	100	171,8	88,49	117	73,36	4059,2	58,20	498,6	7,14	0	0,0
3	10996,1	100	548	86,83	808	80,10	8069,8	73,38	906	8,23	0	0,0
X	6909,4667	100	802,267	88,83	181,8	70,74	4561,5333	62,66	539,333	7,70	0	0,0

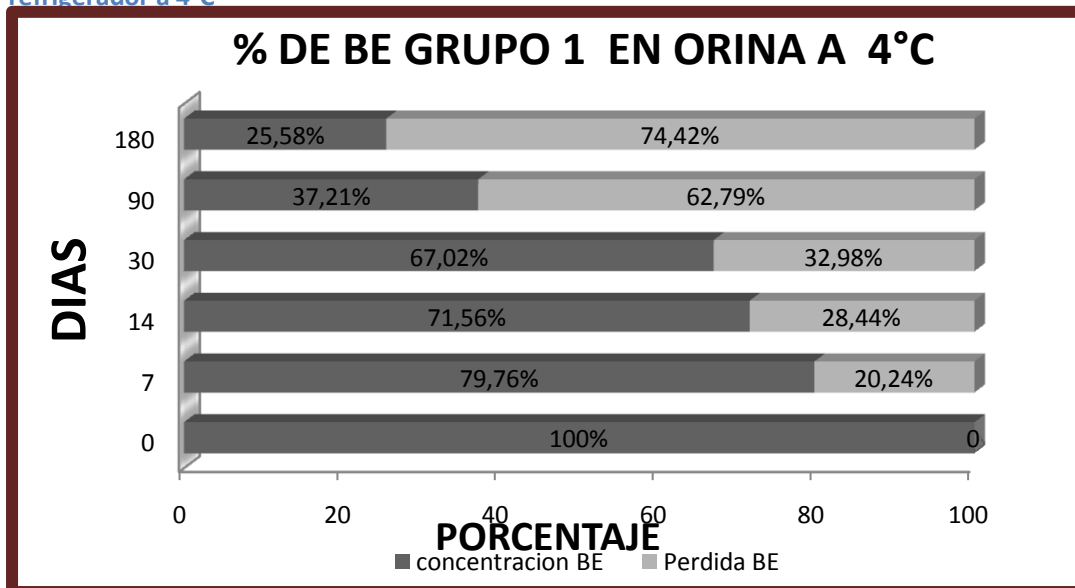
Tabla 7,4-A Concentración de BE grupo 2 (refrigeración 4°C)

BENZOILECGONINA GRUPO 2												
REFRIGERACION 4°C												
M	ANALISIS INICIAL		DIA 7		DIA 14		DIA 30		DIA 90		DIA 18	
	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%
1	42338,2	100	36367	85,890	36217	85,542	28535,94	67,399	462	1,091	450,7	1,064
2	96979	100	68059,86	70,180	61193,74	63,100	46549,92	48,000	218,2	0,225	145,46	0,150
3	104766	100	63773,4	60,8723	60261	57,519	33525,12	32,000	3008	2,871	178,1	0,170
X	81361,0667	100	56066,753	72,316	52557,246	68,720	36203,660	49,133	1229,4	1,395	258,086	0,461

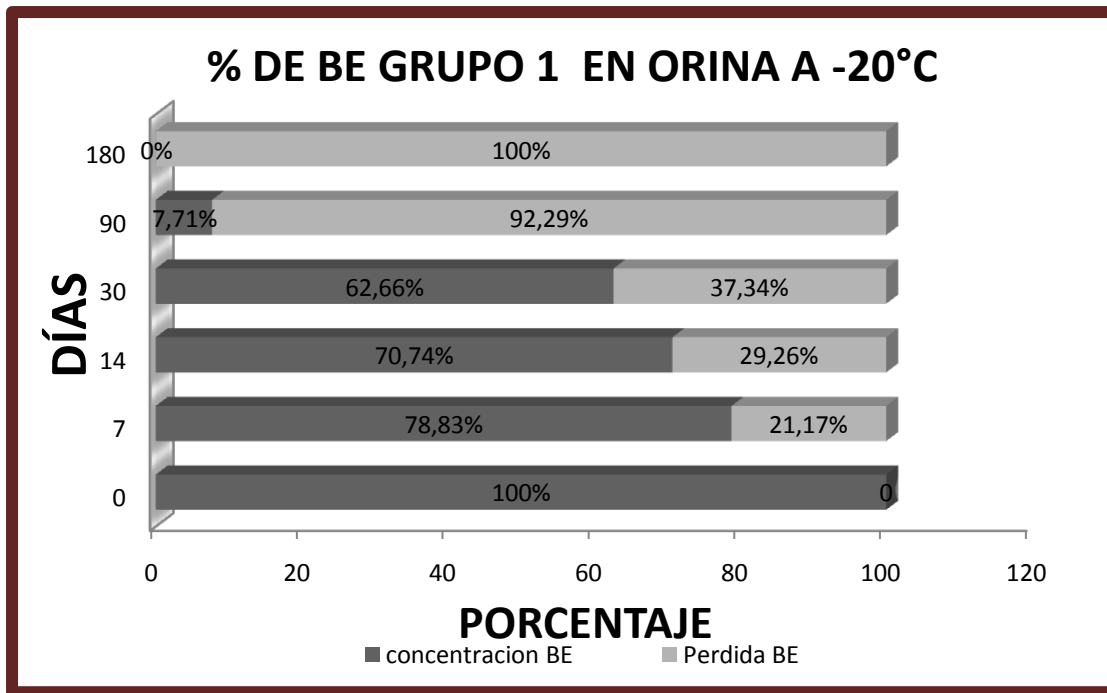
Tabla 7,4-B Concentración de BE grupo 2 (congelación -20°C)

BENZOILECGONINA GRUPO 2												
CONGELACION -20°C												
M	ANALISIS INICIAL		DIA 7		DIA 14		DIA 30		DIA 90		DIA 180	
	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%
1	42338,2	100	33761	79,741	32275	76,231	30868	72,908	2230,52	5,268	0	0,00
2	96979	100	39594	40,827	34424	35,496	29258,3	30,169	4273	4,406	2140	2,206
3	104766	100	81858	78,134	72119	68,838	62353,4	59,516	8398,1	8,016	7586	7,240
X	81361,066	100	51737,667	66,234	46272,666	60,188	40826,566	54,198	4967,206	5,896	3242	3,149

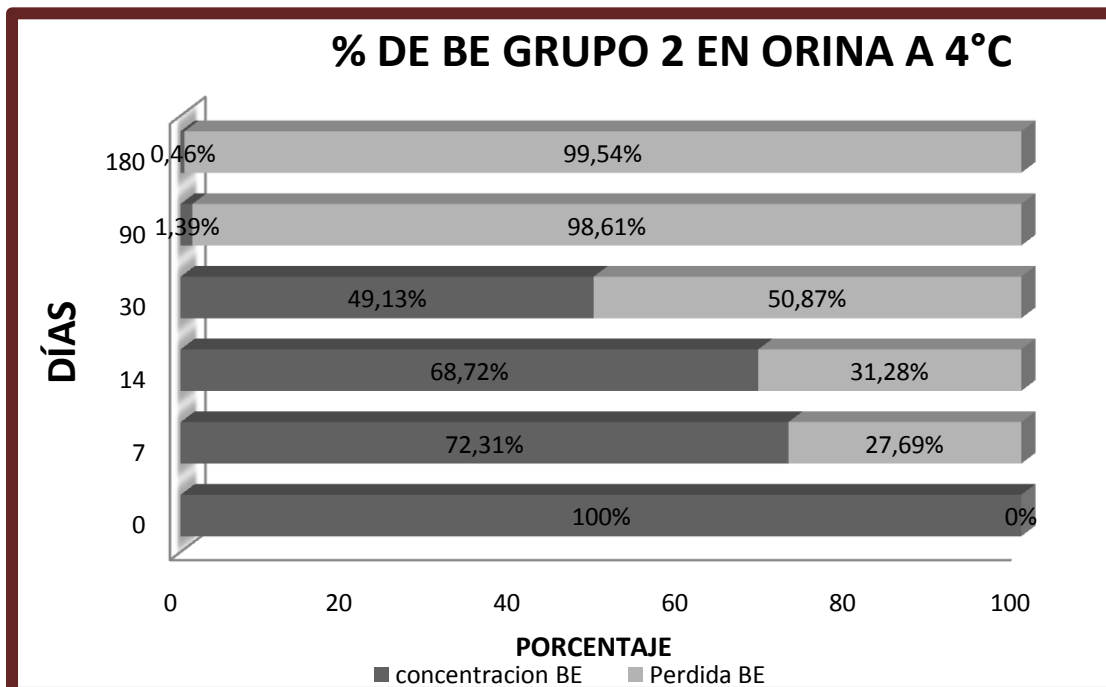
Grafica 7.5-A Porcentaje de BE perteneciente al grupo 1 presente en orina almacenada en refrigerador a 4°C



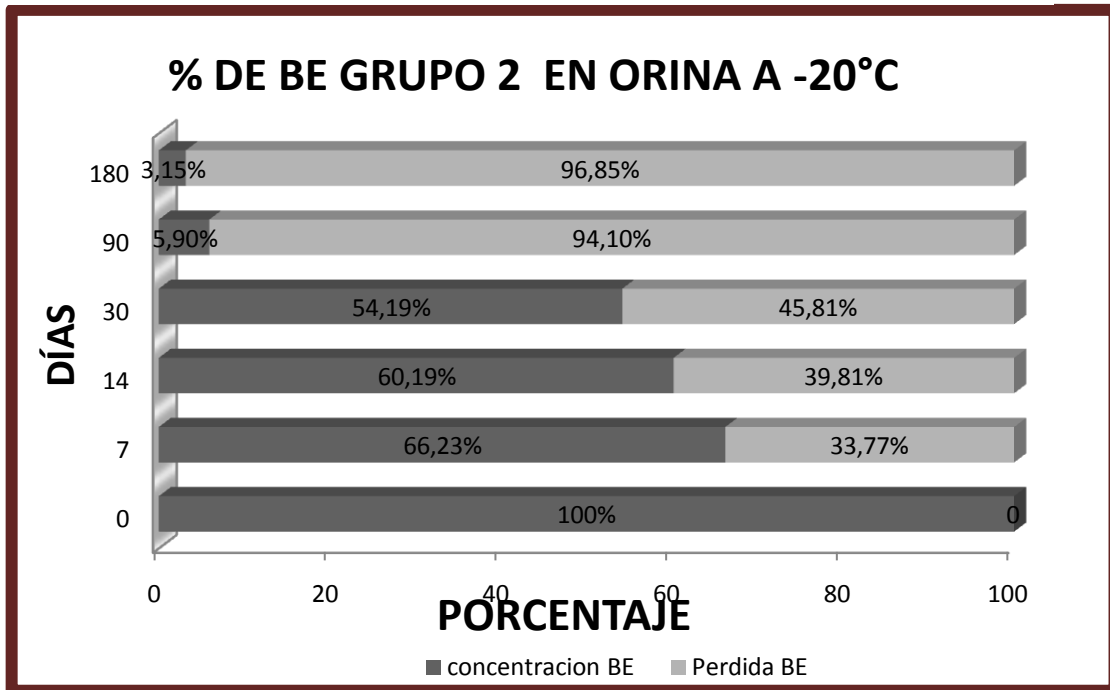
Grafica 7,5-B Porcentaje de BE perteneciente al grupo 1 presente en orina almacenada en congelador a -20°C



Grafica 7,6-A Porcentaje de Be perteneciente al grupo 2 presente en orina almacenada en refrigerador a 4 °C



Grafica 7,6-B. Porcentaje de Be perteneciente al grupo 2 presente en orina almacenada en congelador a -20°C



Para determinar la estabilidad que presentan las muestras estadísticamente hablando se empleó la prueba de Dunnet, la cual consiste en comparar un grupo control contra varios grupos experimentales. Con la frecuencia se requiere determinar si la respuesta de los tratamientos difiere de la correspondiente al control. Con este propósito las diferencias entre los grupos de tratamientos pasan a segundo término. El único interés radica en establecer si existe una diferencia estadísticamente significativa entre cada uno de los tratamientos y el control, considerando sus respectivas medias aritméticas. Con los resultados obtenidos se realizó una tabla de análisis de varianza descrito en las tablas 7.5-A y 7.6-A para el grupo BE-1; mientras que en las tablas 7.5-B y 7.6-B pertenecen al grupo BE-2; con estos datos se determinó el valor de Dunnet, el cual ayuda a determinar la estabilidad de las muestras. Los valores y cálculos que dan origen a los resultados mostrados en las tablas previamente mencionadas se encuentran en el ANEXO I

Tabla 7.5-A. Resultados de ANDEVA para BE grupo 1

Fuente de variación	GI	SC	MC	F
Entre grupo (tratamiento)	10	177629836	17762983,6	1,810760
Dentro de grupo (error)	22	9809683,51	9809683,51	-----
Total	32	393442873	-----	-----
VALOR DE DUNNET			6648,98291	

Tabla 7.5-B. Resultados de ANDEVA para BE grupo 2

Fuente de variación	GI	SC	MC	F
Entre grupo (tratamiento)	10	2277727229 7	2277727230	7,576869
Dentro de grupo (error)	22	300615889,9	300615889, 9	-----
Total	32	2939082187 5	-----	----- -
VALOR DE DUNNET				36807,2766

Tabla 7.6-A Diferencia de medias contra muestra control BE grupo 1

DIA	Diferencia Medias con control BE grupo 1	
	REFRIGERADOR 4°C	CONGELADOR -20°C
7	1451,63333	1107,2
14	1784,46667	1727,66667
30	2068,7	2347,93333
90	3836,8	6370,13333
180	4147,46667	6909,46667

Tabla 7.6-B Diferencia de medias contra control BE grupo 2

DIA	Diferencia Medias con control BE grupo 2	
	REFRIGERADOR 4°C	CONGELADOR -20°C
7	25294,3133	29623,4
14	28803,82	35088,4
30	45157,4067	40534,5
90	80131,6667	76393,86
180	81102,98	78119,0667

Por último, en lo referente a la cinética de las muestras se reportan los resultados en la tabla 7.7.

Tabla 7.7 Orden de Reacción para el metabolito BE

Grupo	Orden de Rx	Energía de Activación (Ea)	
Benzoilecgonina grupo 1	Orden ½	6109,43768	Cal/mol
Benzoilecgonina grupo 2	Orden 2	-13678,14	Cal/mol

7.2.1.1. ANALISIS DE RESULTADOS CUANTITATIVOS PARA BE

En esta parte de la investigación se observan los resultados obtenidos en el grupo del metabolito BE de concentración baja ($X= 6909$ nm/mL) que, en lo referente a las muestras almacenadas con una temperatura de 4°C , los metabolitos tienden a disminuir los primeros siete días en un 20-24%, para seguir esta tendencia hasta llegar a presentar un 37,21% en los 90 días con respecto al metabolito inicial, continuando con este comportamiento el porcentaje disminuye hasta un 25,58% al finalizar el estudio en el día 180.

Con lo que respecta a las muestras del mismo grupo pero almacenadas a -20°C , se observa una pérdida en el porcentaje del metabolito mucho más drástica desde el principio del estudio, ya que en los 90 días del estudio se observó solo un 7,71% del metabolito inicial, y para el día 180 llegaron hasta un 0,0% de presencia del metabolito.

Los resultados en el grupo dos del metabolito BE con una concentración mayor ($X=81361,0667$ ng/mL) no se observó gran variación en las muestras tanto las almacenadas a 4°C como aquellas almacenadas a -20°C .

Ambas muestras van perdiendo porcentaje en la concentración del metabolito hasta llegar a los 30 días en donde prácticamente desaparece la mitad del porcentaje, 50,87% para la muestra a 4°C y 45,81% para las muestras de -20°C . A partir de esa fecha aquellas muestras que fueron almacenadas en la condición de 4°C , a los 90 días pierden el 98,61% llegando así al día 180 únicamente con la presencia de solo 0,46% de porcentaje del metabolito inicial. Así mismo en las muestras a -20°C a los 90 días, presentan una pérdida del 94,10% de concentración del metabolito hasta llegar a un total del 96,85% menos que en la concentración del metabolito inicial.

Como se puede observar en el grupo 1 independientemente del tipo de almacenamiento, las muestras presentan un comportamiento similar los primeros 30 días llegando a una pérdida de porcentaje del 32 al 37% de ahí las muestras a 4°C presentan una pérdida constante hasta llegar al día 180 con una ausencia del 74,42%, no así la muestra a -20°C en la cual se observa una baja más significativa de 92,29% a los 90 días y para el día 180 se tiene un 100% de pérdida del metabolito inicial.

De la misma manera las muestras del grupo 2, el porcentaje de ausencia a los 30 días es prácticamente al 50% para que posteriormente en las muestras almacenadas en 4°C presentan una pérdida total del 98,61% a los 90 días llegando únicamente con la presencia de solo 0,46% del metabolito al finalizar el estudio a los 180 días.

En las muestras a -20°C el comportamiento es prácticamente igual a los 30 días, llegando a los 90 días a 94,10% de ausencia y al 96,85% al día 180.

Este comportamiento de ausencia de porcentaje en la concentración del metabolito se debe a que a pesar de no existir un método similar de almacenamiento en ambos grupos es posible que la estabilidad de las muestras en cada una de las condiciones esté directamente relacionada a la naturaleza de la matriz y de la degradación del metabolito; es decir, la variación del porcentaje del metabolito está dado por la naturaleza de éste y de las demás moléculas presentes en la orina, las cuales pueden actuar como catalizadores para la rápida transformación de los metabolitos en sus correspondientes moléculas de desecho.

Es por esto que, en el caso de las muestras del grupo uno independientemente del tipo de almacenamiento éstas muestras tienen una concentración mas baja de metabolito, el cual se dispersa en menor cantidad en la matriz teniendo una interacción menor con las demás moléculas

dispersas; no así a las muestras del grupo dos en donde se observa aparentemente una pérdida mayor del metabolito por encontrarse más disperso en la matriz pudiendo tener mayor interacción con las demás moléculas, sin embargo se nota que al final del día 180 todavía existe presencia aunque mínima del metabolito, esto debido a la concentración inicial.

Por último, con respecto a la cinética que corresponde a los metabolitos bajo estudio se tiene que para el grupo de BE con una concentración baja, obedece un orden de reacción de $\frac{1}{2}$, posiblemente como lo describe la literatura, al tener en cierto momento mayor cantidad de agua se considera que tiene un valor constante durante la reacción, pues comparando con los demás resultados de este grupo, al finalizar el estudio, existe una cantidad significativamente baja de metabolito.

Mientras que para el grupo de BE con concentración alta, presenta una reacción de segundo orden, que nos confirma que la velocidad de reacción es proporcional a la concentración tanto del metabolito como de la matriz.

En lo que concierne a la Energía de Activación (E_a), las muestras del grupo BE 2 son las que presentan una E_a menor a 0,0 cal/mol lo que confirma que la reacción ocurre más rápido, para que al finalizar el estudio no exista presencia del metabolito.

Sin embargo, todas las muestras bajo estudio no cumplen con la teoría de Arrhenius, la cual explica que la cantidad de colisiones que generan la velocidad de reacción es mayor conforme se incrementa la temperatura, pues como ya se analizó con anterioridad el comportamiento real de las muestras es que a menor temperatura es mayor la velocidad de reacción.

7.2.2. 11-nor-9-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol

Las muestras de THC fueron incluidas en un solo grupo para su análisis debido a que presentaron concentraciones similares.

En las tablas 7.8 y 7.9, se muestran las concentraciones obtenidas a lo largo del estudio para el metabolito THC, leídas en los tiempos programados y almacenadas en contenedores a las temperaturas de 4° y -20°C; mientras que en las graficas 7.8 y 7.9 se encuentran representados los resultados pertenecientes a dichas tablas (concentración de metabolito vs. Tiempo).

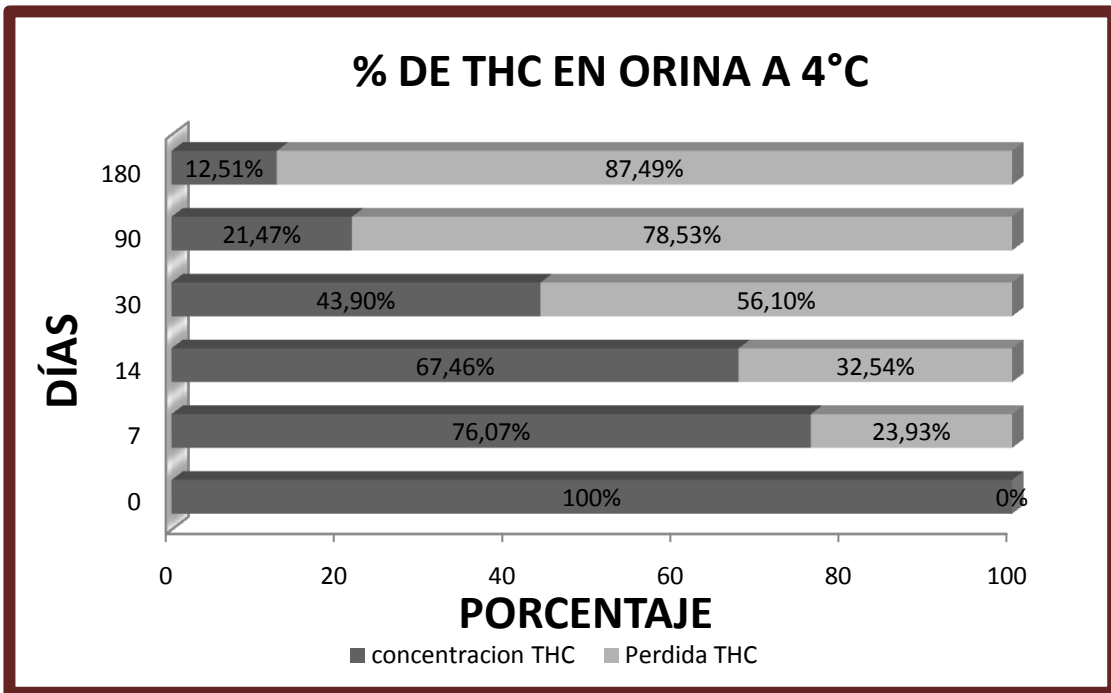
Tabla 7.8. Concentración THC (refrigeración 4°C)

THC												
REFRIGERACION 4°C												
M	ANALISIS INICIAL		DIA 7		DIA 14		DIA 30		DIA 90		DIA 180	
	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%
1	169,32	100	163,66	96,657	152,58	90,113	100,62	59,425	46,62	27,533	19,77	11,676
2	168	100	133,62	79,535	121,28	72,190	99,08	58,976	28,1	16,726	7,36	4,381
3	199,36	100	42,21	21,172	42,84	21,488	21,09	10,578	7,9	3,9626	0	0,000
4	274,34	100	235,98	86,017	224,18	81,716	120,34	43,865	46,24	16,855	17,38	6,352
5	337,6	100	327,32	96,954	242,44	71,812	157,42	46,629	142,68	42,263	135,64	40,177
X	229,724	100	180,558	76,067	156,664	67,464	99,7100	43,895	54,308	21,468	36,03	12,514

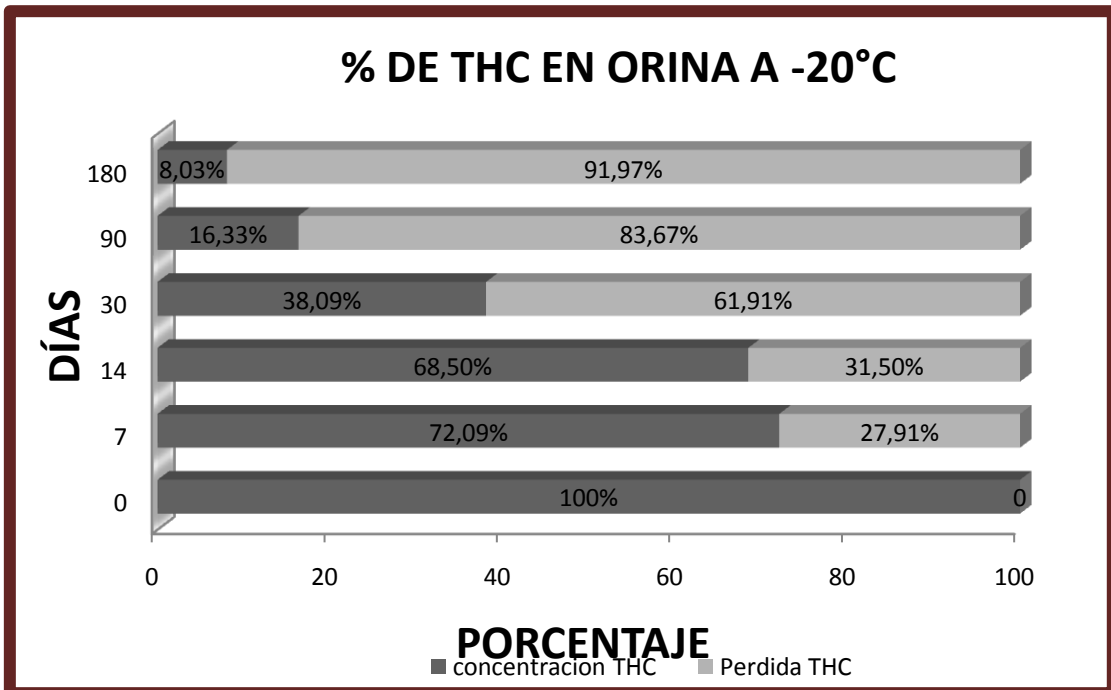
Tabla 7.11. Concentración THC en congelación -20°C

THC												
CONGELACION -20°C												
M	ANALISIS INICIAL		DIA 7		DIA 14		DIA 30		DIA 90		DIA 180	
	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%	CONC. mg/mL	%
1	169,32	100	44,18	26,092	46,26	27,321	22,78	13,453	9,34	5,516	0	0,000
2	168	100	117,98	70,226	113,76	67,714	56,14	33,416	20,9	12,440	6,98	4,154
3	199,36	100	170,82	85,684	161,22	80,868	95,48	47,893	45,72	22,933	23,56	11,818
4	274,34	100	238,78	87,037	211,58	77,123	125,32	45,680	50,48	18,400	33,72	12,291
5	337,6	100	308,62	91,415	301,98	89,449	168,94	50,041	75,56	22,381	40,21	11,910
X	229,7240	100	176,076	72,091	166,96	68,495	93,7320	38,097	40,4	16,334	20,894	8,0349

Grafica 7.8. Porcentaje de THC presente en orina almacenada en refrigerador a 4°C



Grafica 7.9. Porcentaje de THC presente en orina almacenada en refrigerador a -20°C



Para determinar la estabilidad que presentan las muestras, se realizó un análisis de varianza contra un control. Con los resultados obtenidos se realizó una tabla de análisis de varianza descrito en la tabla 7.10; con estos datos se determinó el valor de Dunnet, el cual ayuda a determinar la estabilidad de las muestras con base a las discrepancias entre medias de los tratamientos con el control (tabla 7.11).

Tabla 7.10. Resultados de ANDEVA para THC

Fuente de variación	GI	SC	MC	F
Entre grupo (tratamiento)	10	230493,169	23049,3169	4,06383152
Dentro de grupo (error)	44	5671,81903	5671,81903	
Total	54	480053,207		
VALOR DE DUNNET			159,878072	

Tabla 7.11 Diferencia de medias contra control THC

DIA	Diferencia Medias con control THC	
	REFRIGERADOR 4°C	CONGELADOR -20°C
07	24,686	30,3
14	47,496	39,416
30	106,684	112,644
90	152,068	165,976
180	170,346	185,482

En la tabla 7.12 se muestra el orden de reacción que describe mejor le comportamiento del metabolito de THC.

Tabla 7.12 Orden de reacción para el metabolito THC

Metabolito	Orden de Rx	Energía de Activación (Ea)
THC	Orden 2	3,224901 Cal/mol

7.2.2.1. ANALISIS DE RESULTADOS CUANTITATIVOS PARA THC

En esta parte de la investigación en lo que respecta al metabolito THC, en donde las muestras no fueron divididas en grupos, debido a que la diferencia de concentración del metabolito es relativamente igual.

Ambas condiciones, (4°C y -20°C) se observa una pérdida constante desde los primeros 7 días llegando a los 30 días con una ausencia de concentración de metabolito del 56,10% en la condición de 4°C y una pérdida de 61,91% en aquellas almacenadas en -20°C, el resto del tiempo del estudio los grupos siguen comportándose semejantes con un descenso constante de pérdida del metabolito hasta llegar al día 180 con la presencia de solo el 12,51% de concentración del metabolito en el grupo de 4°C y de un 8,03% en el grupo de -20°C.

En lo referente a la estabilidad calculada estadísticamente utilizando el método de Dunnet, en las muestras del metabolito THC, existe una mayor conservación en 4°C hasta por 90 días, ya no siendo considerado estable después de ese tiempo, mientras que en la condición de -20°C, dejan de ser estables a partir de los 30 días.

En lo que concierne a la Energía de Activación (Ea), las muestras de THC, presentan un orden de reacción 2 y una Ea relativamente baja.

De igual forma que las muestras de Be, no cumplen con la teoría de Arrhenius.

8. CONCLUSIONES

Una vez observados los resultados de este estudio, se establece que el comportamiento de los metabolitos BE y THC en almacenamiento a lo largo del tiempo permiten concluir que entre las variables que influyen en la estabilidad de las muestras es la temperatura debido a que la pérdida de concentración de metabolitos con respecto al tiempo es similar.

Sin embargo, cabe mencionar que pasando el tiempo es más rápida esta pérdida en las muestras congeladas (-20°C) que las que se encuentran en refrigeración (4°C) y no como se estipuló en un principio del estudio.

Referente a la estabilidad de la Benzoilecgonina:

- Disminuye la concentración hasta cero cuando es almacenada por periodos mayores a 180 días a una temperatura de -20°C.
- En un periodo de almacenamiento de 7 a 90 días muestra una pérdida mayor del 98% del metabolito en una temperatura de 4°C al tener una concentración inicial alta.
- Cuando se encuentra almacenada a -20°C durante más de 180 días muestra una pérdida del metabolito del 96% al tener una concentración inicial alta.
- Cuando la muestra tiene una concentración inicial baja, muestra una pérdida del 100% a los 180 días de ser almacenada a temperatura de -20°C.
- Pierde un 74% del metabolito en un periodo de almacenamiento de 180 días a temperatura de 4°C.
- Estadísticamente, las muestras de BE dejan de ser consideradas estables a partir de los 30 días si la concentración inicial es alta, cuando la concentración inicial es baja se considera estable hasta los 90 días de almacenamiento.

En cuanto a la estabilidad de THC se concluye:

- La concentración del metabolito muestra una pérdida de hasta 83% por periodos mayores de 90 días a una temperatura de -20°C.
- Cuando la muestra es almacenada a 4°C presenta un 87% de pérdida de metabolito.
- Estadísticamente las muestras de THC permanecen estables hasta 30 días de almacenamiento.

En ambos metabolitos, la concentración inicial es directamente proporcional a la degradación de la misma, es decir, a mayor concentración inicial, la degradación será más rápida que aquellas muestras en donde la concentración inicial sea menor, ya que la degradación del metabolito será más lenta.

De igual forma la estabilidad de las muestras va ligada a la naturaleza de la matriz, en base a la densidad y el pH; esto en función de que entre más alcalina y la presencia de un precipitado puede llegar a ser una alerta de la estabilidad real de las drogas o sus metabolitos en las muestras almacenadas.

Por último, es importante mencionar que los ciclos de congelado-descongelado también actúan como un factor para alterar la estabilidad de los metabolitos.

9. PROPUESTA Y/O RECOMENDACIONES

Dados los resultados obtenidos en este estudio se propone para una segunda etapa:

- Considerar como una de las variables bajo estudio la concentración inicial.
- Que los períodos de reanálisis sean en lapsos más cortos de tiempo.
- Considerar como variable otras temperaturas de almacenamiento.

Las recomendaciones para los laboratorios que almacenan muestras para realizar reanálisis transcurrido el tiempo:

- No efectuar reanálisis posterior a los 90 días de almacenadas.
- No almacenar muestras a temperaturas de -20°C , esto por la rápida degradación que pueden llegar a presentar.
- Los mecanismos de congelado-descongelado no sean tan repetitivos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Norma oficial mexicana. Nom-073-SSA1-1993. Estabilidad de medicamentos. Diario oficial de la federación. 03-08-96.
2. USP 32 NF 27 2009. National formulary. United States Pharmacopeial Convention, inc. 2009.
3. Sykes. A Peter. Guidebook to Mechanism in Organic Chemistry 9^a ed. New York: Longman Scientific and Technical; 2004: 33-35; 36-45.
4. Smith Dennd. Pharmacokinetics and metabolism in drug design. New York: Wiley-Uch; 2003:02-60.
5. Hanne Thonnesen. Photostability of drugs and drug formulations 2^a ed. New York: CRC Press, 2004: 10-115.
6. Halsted CH,. The laboratory in Clinical Medicine, 4^a ed. Philadelphia: WB Saunders, 2005: 400-419
7. Plásticos
8. Zhang Donglu. Drug metabolism in drug: design and development. Basic concepts and practice. New York: Wiley, 2008:18-30; 37-73; 113-122; 137-171; 239-405.
9. Sin autor (en línea) (07/12/09). Disponible en <http://www.conacid.salud.gob.mx>
10. Sin autor (en línea)(07/12/09). Disponible en <http://www.degepi.salud.gob.mx>
11. Ley General de Salud. México D.F. Sista S.A. De C.V. Doi 30-12-2009.
12. Katzung Bertram. Basic and clinic pharmacology 10^a ed. San francisco: MC Graw Hill, 2006: pp
13. Craig Charles. Modern pharmacology with clinical applications 6^a ed. New York: MC Graw Hill, 2007: 83-141; 163-177.
14. Atkinson Arthur. Principles of clinical pharmacology 2^a ed. San Diego: El Sevier, 2007: 143-160; 163-177.
15. Susuki Osamu. Drugs and poisons in humans. A handbook of practical analysis. Berlin: Springer, 2005: 11-71.
16. Whong Raphael. Drug of abuse: body fluid testing. New Jersey: Humana press; 2005: 11-71.
17. Fischbach Frances. Manual de pruebas diagnosticas II 4^a ed. México: MC Graw Hill:2007
18. Part ii Department of health and human services: substances abuse and mental health service administration. Federal register vol 69, no 71. Tuesday, april 13, 2006.
19. Jankel CA. Effect of drug interactions. *Am. J. Hosp. Pharm.* (2004) 51, 661-6.
20. Pedersen O. Pharmaceutical chemical Analysis: Method for identification and limits test. New York: Taylor and Francis, 2006: 93-143.
21. Yinon Jehuda. Advances in forensic applications of mass spectrometry. Florida: CRC Press, 2006: 17-30

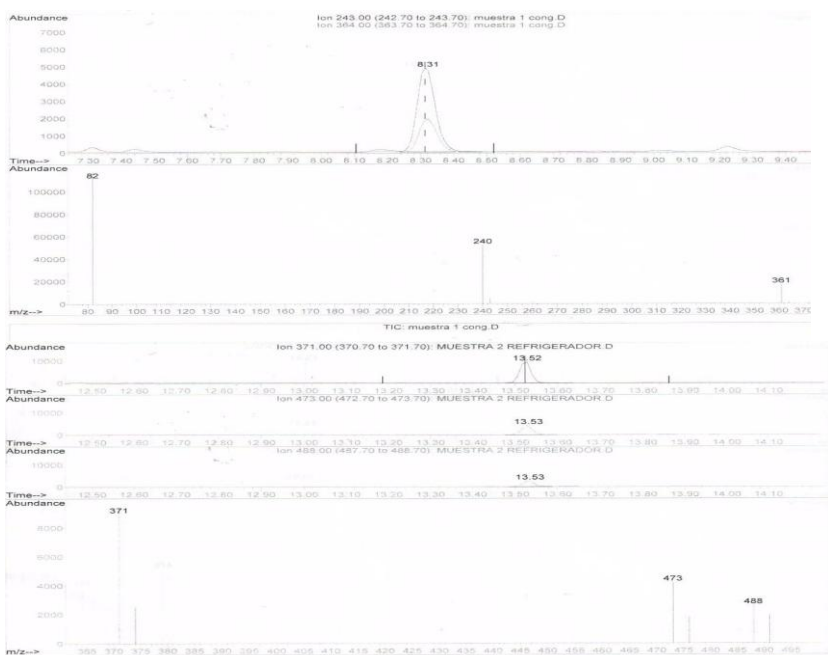
11. ANEXOS ANEXO 1

Informe de análisis cualitativo ordinal de una muestra de Cannabinoides y Cocaína

Nombre:						Ensayo: THC5Q			
ID de la muestra: THCCON1						N° del ensayo: 2009			
ID de paciente:						Módulo / N° de serie: 1 / c800604			
Fecha/hora de extracción:						Información de la calibración			
Comentario muestra:						Lote del calibrador: 58472266			
						Fecha/hora cal: 28.02.2009 / 12:01			
						Lote principal del reactivo: 63796M100			
						N° de serie: 01628			
Fecha de finalización: 02.03.2009				Procedencia:					
Hora de finalización: 16:18				Doctor:					
ID de usuario: ADMIN									
G / P	Resultado	Unidades	Rango	Dilución	Alertas	Código	Absorbancia	Cubeta	
E325/3	91.98			STANDARD			0.5592	29	
Reactivo									

Nombre:						Ensayo: CocQ			
ID de la muestra: M5						N° del ensayo: 2855			
ID de paciente:						Módulo / N° de serie: 1 / c800604			
Fecha/hora de extracción:						Información de la calibración			
Comentario muestra:						Lote del calibrador: 58423190			
						Fecha/hora cal: 31.10.2008 / 12:27			
						Lote principal del reactivo: 59566M100			
						N° de serie: 01156			
Fecha de finalización: 03.11.2008				Procedencia:					
Hora de finalización: 13:59				Doctor:					
ID de usuario: ADMIN									
G / P	Resultado	Unidades	Rango	Dilución	Alertas	Código	Absorbancia	Cubeta	
B551/5	630.38			STANDARD			0.6690	136	
Reactivo									

Grafica de un analisis representativo cuantitativo de muestras de orina positivas a THC y Benzoilecgonina



ANEXO 2 MARIHUANA

	refrigeración										Congelador					T O T A L								
	dia cero	dia 7	dia 14	dia 30	dia 90	dia 180	dia 7	dia 14	dia 30	dia 90	dia 180	Xij	X2ij	Xij	X2ij		Xij	X2ij	Xij	X2ij				
1	57,58	2764,656	169,37	28669,26	163,66	26784,95	100,62	10124,28	46,62	2173,624	19,77	390,829	44,18	1951,874	46,76	2199,804	22,78	518,924	9,34	87,236	0	0		
2	168	28724	133,62	17854,304	121,28	14708,838	99,08	9816,864	28,1	789,61	7,36	54,168	117,96	13919,28	113,76	12941,37	56,14	3151,696	20,9	436,81	6,98	48,704		
3	199,36	39744,48	42,21	1781,684	42,84	1855,266	21	441	62,41	7,9	0	170,82	29179,47	161,22	25991,888	95,48	9116,404	45,72	2090,384	23,56	555,076			
4	274,34	75362,45	235,98	55686,50	224,18	50756,67	120,34	14481,71	46,24	2138,136	17,38	302,064	238,78	57045,88	211,58	44766,04	125,32	15705,10	50,48	2548,204	33,72	1137,084		
5	337,6	113974,4	327,32	107138,38	242,44	58777,15	157,42	24781,06	142,68	20857,50	135,64	18398,26	308,62	95246,304	301,98	91191,90	168,94	28540,72	75,56	5709,336	40,21	1616,844		
Σx	1031,88	906,45	794,4	498,46	278,54	180,15	880,38	834,8	468,66	202	104,47	6175,19												
Σx²	259469,24	211140,9	152862,5	59645,00	75521,64	19145,24	197312,8	177081,2	57062,84	4	10871,908	3357,676	117339,96											
Σx²/n	82524,40	63107,36	24846,25	73733,97	32454,02	77508,94	219642,6	69689,04	219642,6	40804	10913,90	461909,62												
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
x	206,376	181,66	158,98	99,692	54,308	36,03	176,076	166,96	93,732	40,4	20,894	1235,038												

Suma de cuadrados total corregida

$$Sctot = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} = 488953,207$$

suma de cuadrados dentro del grupo

$$SCdg = Sctot - Scgp = 249560,0372$$

Valor F

$$CMdg/CMdg = F = \frac{4,06383}{152}$$

Suma de cuadrado entre grupo

$$Scgp = \frac{\sum (\sum x_{ij})^2}{n} - \frac{(\sum x_i)^2}{N} = 230493,169$$

grados de libertad

gl _{tot} = N - 1	54
gl _{gp} = K - 1	10
gl _{dg} = N - K	44

Fuente de variación

Entre grupo (tratamiento)	gl	SC	MC	F
Entre grupo (tratamiento)	10	230493,169	23049,3169	4,06383152
Dentro de grupo (error)	44	5671,81983	5671,81983	
Total	54	488953,207		

Cuadrado de Medios entre grupos

$$Cmg = Scgp/gleg = 23049,3169$$

Cuadrado medios dentro del grupo

$$CMdg = SCdg/gl_{dg} = 5671,81903$$

Dunnet

$$d = t \{ \frac{gl_1 \cdot k_1 \cdot a_j}{2 \cdot CMdg \cdot n} \} = 159,878072$$

COCAÍNA GRUPO 2

muestras	Congelador																													
	día 0		día 7		día 14		día 30		día 90		día 180		día 0		día 7		día 14		día 30		día 90		día 180							
	X̄	X̄ ₂	X̄	X̄ ₂	X̄	X̄ ₂	X̄	X̄ ₂	X̄	X̄ ₂	X̄	X̄ ₂	X̄	X̄ ₂	X̄	X̄ ₂	X̄	X̄ ₂	X̄	X̄ ₂	X̄	X̄ ₂	X̄	X̄ ₂	X̄	X̄ ₂				
1	4338,2	179523	3657	13253680	3627	131167108	2853,94	814298671,7	462	213444	451,7	285130	3376	1139865	3275	1041675	625	3086	952833	228152	487521	9,47	0	0	0	0	0	0	0	0
2	96979	940926	481	68859,8	6	61193	463214563	216689352	218,2	40611,24	145,46	2119	3939	1567684	34024	1183011	8,3	2925	856948	4273	182585	29	2140	457960	0	0	0	0	0	0
3	104766	1097351	4756	63773,4	406706548	365138812	3325,12	1123833671	3008	9488064	178,1	31719	8185	6700732	72119	5201150	3,4	6235	380794	8388,1	785280	83,01	7586	575473	96	96	96	96	96	96
ΣX	244883,2	168200,26	15767,74	108610,98	3688,2	774,26	9389119,24	9488272	9488272	171	138818	1224	14801,62	9726	621769	6888	6888	6888	6888	6888	6888	6888	6888	6888	6888	6888	6888	6888	6888	6888
ΣX ²	221735	100214978	0	86873302	4185128395	136028	19	599479	2416	19	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
(ΣX) ²	5957660	2829132	7464	117863449	136028	19	599479	2416	19	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	81361,06	50866,7	5333	36203,66	1729,4	759,087	7,67	4882	6,567	4967,206	667	3242	34024	457960	487521	9,47	2140	457960	487521	9,47	2140	457960	487521	9,47	2140	457960	487521	9,47	2140	457960

SUMA DE CUADROS TOTAL CORREGIDA

$$Scorr = \sum X^2 - T...^2/N = 29390821875$$

SUMA DE CUADROS DENTRO DEL GRUPO

$$SCdg = Scorr - Scgr = 6613549578$$

Valor F

$$CMdg/CMdg = F = 7,576869042$$

Suma de cuadrado entre grupo

$$Scgr = (\sum Cdg)^2/n - T...^2/N = 22177230$$

grados de libertad

gl _{trat} = k - 1 =	32
gl _{erro} = N - k =	10
gl _{total} = N - 1 =	22

Fuente de variación	gl	SC	MC	F
Entre grupo (tratamiento)	10	2217723	221772,3	7,57
Dentro de grupo (error)	22	3006158	30061,58	9
Total	32	2939082	185596,3	

Cuadrado de Medios entre grupos

$$Cmegr = Scgr/ glgr = 22177230$$

Cuadrado medios dentro del grupo

$$Cmdeg = SCdg/ gldeg = 300615889,9$$

Dunnet

$$d = t(g1, k, \alpha) \sqrt{2CMe/n} = 36807,2766$$