



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

DIPLOMADO EN QUIMICA LEGAL

**IDENTIFICACIÓN DE BARBITÚRICOS
EN FLUÍDOS BIOLÓGICOS**

TESINA

**PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

RUBÉN DÍAZ AYALA

ASESOR: M. en C. VALENTIN ISLAS PÉREZ



MÉXICO D.F

JUNIO 2011



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.

CONTENIDO	PAG
I.-Resumen	1
II.- Introducción	2
• Formas de empleo y riesgo del consumo de barbitúricos	2
• Barbitúricos e inyección letal	3
• Investigación forense de barbitúricos	4
• Aspectos analíticos de la determinación de drogas en fluidos	5
III. - Planteamiento del Problema	6
IV.- Objetivo	7
V.- Marco Teórico	8
• Relación Estructura actividad	10
• Farmacología de los barbitúricos	14
• Aspectos Médicos legales en casos de muerte	31
• Aspectos Criminalísticos	31
• Tipos de muestra	36
VI.- Comparación de Métodos	43
VII.- Discusión de Resultados	66
VIII.- Conclusiones	68
IX.- Referencias Bibliográficas	69

I.- RESUMEN

Un porcentaje importante de las urgencias hospitalarias son debido a intoxicaciones medicamentosas. De estas, las causadas por analgésicos antiinflamatorios y antipiréticos no esteroideos. (AAINES), hipnóticos, sedantes y antibióticos son las más comunes. De los medicamentos asociados a intoxicaciones, los barbitúricos ocupan un lugar importante por diversas razones, una de las cuales es su estrecho margen de seguridad. Administrados en altas dosis, los barbitúricos se utilizan para suicidio médico asistido, y en casos de pena de muerte por inyección. Estas sustancias se descubrieron a principios del siglo XX y fueron prescritas como sedantes hipnóticos hasta 1950, cuando aparecieron las benzodiazepinas.³⁷

Desde tiempo atrás, los barbitúricos han sido usados con fines suicidas. De hecho, eran la principal causa de este tipo de hechos. Un ejemplo típico de este grupo de fármacos es el Fenobarbital, el cual es un agente antiepiléptico frecuentemente utilizado en el tratamiento contra las crisis tónico-clónicas parciales y generalizadas. Debido a su estrecho rango terapéutico y elevada capacidad depresora del sistema nervioso central, junto con su capacidad de producir autoinducción enzimática, es relativamente fácil alcanzar efectos indeseables en casos de sobredosis y esto lo hace uno de los fármacos más frecuentemente monitorizados en hospitales.^{1,2,3.}

Posterior a la síntesis del fenobarbital, se obtuvieron otros fármacos de igual naturaleza química en busca de mejorar los efectos farmacológicos. Además de los Estados Unidos, existe también como método de ejecución en China, Guatemala, Filipinas y Tailandia. Sus precedentes son los experimentos y las ejecuciones llevadas a cabo durante el nazismo mediante inyecciones de productos químicos: en los campos de exterminio muchas personas murieron a causa de estas actividades.^{44.}

Se revisan y discuten los métodos analíticos utilizados para la determinación forense de barbitúricos empleando pruebas de orientación (métodos cualitativos, ensayos cromáticos), pruebas confirmatorias (métodos cualitativos) C.G. Espectrometría de Masas, CLAE, considerando como prototipo al fenobarbital^{1,2,3.}

II.-INTRODUCCIÓN

La muerte por sobredosis de medicamentos es un problema recurrente en nuestra sociedad debido a que la gente consume sustancias sin prescripción ni vigilancia médica de estos. Los barbitúricos, se consideran una de las drogas más adictivas, fuera de contexto médico, comúnmente los utilizan para obtener una sensación de euforia y relajación. Según datos reportados, la mayoría de los ingresos hospitalarios del área de urgencias son debido a la ingestión por sobredosis de AAINES, sedantes e hipnóticos, entre otros medicamentos. De estos, los barbitúricos ocupan un lugar importante por sus antecedentes históricos pues han sido usados con fines suicidas. Actualmente, han sido desplazados por la benzodiacepinas y su adquisición requiere de receta médica. Su uso es ilegal sin prescripción y supervisión médica.

Formas de empleo y riesgos del consumo de barbitúricos.

Los medicamentos implicados con más frecuencia en los casos de intoxicación son: benzodiacepinas, analgésicos, antidepresivos, barbitúricos y medicamentos activos contra los trastornos cardíacos. Según el fármaco y la dosis ingerida, pueden producirse alteraciones de la conciencia, problemas cardiorrespiratorios graves, convulsiones y lesiones hepáticas y renales.

Los barbitúricos son sustancias que se pueden consumir de diferentes maneras. Puede ser vía oral o vía intravenosa. Se presentan en cápsulas, tabletas o elixir. Sus efectos son causados por la depresión gradual del Sistema Nervioso Central (SNC).

Los barbitúricos son sustancias adictivas. Generan tolerancia rápidamente; es decir, los efectos producidos con las primeras dosis consumidas decaen con el uso, necesiéndose mayores cantidades. La sobredosis es poco habitual, si no se mezcla con otras sustancias. La dependencia puede ser física, como psicológica, así como el freno de consumo luego de una regularidad o abuso, puede producir síndrome de abstinencia. Aunque el uso médico de los barbitúricos ha disminuido desde la década de los 70s, y su consumo, como droga de abuso ha ido en declive, las encuestas han encontrado que el abuso en la escuela secundaria ha aumentado en los últimos 10 años, una razón común del abuso de barbitúricos es para contrarrestar los síntomas de otras drogas, como la cocaína y las metanfetaminas, pues contrarrestan la emoción y el estado de alerta obtenidos de las drogas estimulantes.

Utilizadas en dosis altas pueden provocar la muerte, tanto accidental como suicida, debido a su estrecho margen de seguridad, la intoxicación homicida es excepcional, y la accidental ocurre con la ingestión por ignorancia o descuido, de una dosis mayor que la terapéutica: otras veces por susceptibilidad especial o acumulación de dosis por deficiencia, en su eliminación.³⁷

- **Barbitúricos e inyección letal**

Los barbitúricos son las sustancias usadas en la pena de muerte por inyección letal, en aquellos países que la tienen implementada. La inyección letal es el último método de ejecución incorporado al catálogo de formas de aplicar la pena de muerte. Se aprobó por primera vez en los Estados Unidos, en Oklahoma y Texas, en 1977. En la actualidad es el método de ejecución más utilizado en los Estados Unidos. Recientemente, se ha empezado a cuestionar que sea un método de ejecución indoloro, en contra de lo que aseguraban sus promotores.

- "Este método de ejecución consiste en inyectar por vía intravenosa y de manera continua una cantidad letal de un barbitúrico de acción rápida en combinación con un producto químico paralizante. El procedimiento es similar al utilizado en un hospital para administrar una anestesia general, pero los productos son inyectados en cantidades letales. En Texas, uno de los 19 estados de los Estados Unidos en donde la ejecución se realiza por inyección letal, se usan tres sustancias conjuntamente: tiopentato sódico, bromuro de pancuronio y cloruro potásico. La primera es un barbitúrico que hace perder el conocimiento al preso, la segunda es un relajante muscular que paraliza el diafragma, impidiendo así la respiración, y la tercera provoca un paro cardíaco. "Aunque los defensores de la inyección letal pretenden que es más humana que otros métodos de ejecución, varios médicos han descrito los problemas que pueden surgir. Algunos presos con un historial prolongado de uso indebido de estupefacientes pueden tener venas cicatrizadas y puede ser necesaria una intervención quirúrgica para llegar a una vena más profunda. Si el preso forcejea durante la ejecución, el veneno puede entrar en alguna arteria o en el tejido muscular y causar dolores. Si los componentes de la solución letal no están equilibrados o si se combinan prematuramente, la mezcla puede espesarse, obstruir las vías venosas y hacer que la muerte tarde más tiempo en llegar. Si el barbitúrico anestésico no actúa rápidamente, el condenado puede darse cuenta de que se está asfixiando a medida que sus pulmones se paralizan." ⁴⁴

- **Investigación Forense de barbitúricos**

En casos de muerte por ingestión de dosis altas de barbitúricos es importante identificar el tipo de sustancia, para determinar con precisión, claridad y objetividad las causas de muerte y contribuir así a conocer la verdad histórica del hecho investigado. Es importante el aislamiento e identificación y determinación cuantitativa de los tóxicos tanto como el sujeto vivo como en cadáver, con el fin de permitir el diagnóstico y esclarecimiento de los hechos con fines legales, ello permitirá establecer las formas de análisis y muestras de los casos que se van presentando de consumo de mezclas de drogas y las innovaciones de los consumidores para que los análisis den resultados negativos, generalmente se utilizan inmunoensayos para realizar los primeros análisis en hospitales, centros de rehabilitación y/o laboratorios de "respuesta rápida", pero estos ensayos sólo permiten detectar un grupo limitado de sustancias a bajas concentraciones.

Es por ello, que desde más de una década varios grupos de investigación, que incluyen los laboratorios y algunos de ellos en conjunto con empresas de elementos de cromatografía, han intentado desarrollar y/o mejorar los métodos cromatográficos de análisis simultaneo de un rango amplio de drogas.²⁴

- **Aspectos Analíticos de la determinación de drogas en fluidos biológicos**

Hoy en día, la detección de xenobióticos en matrices biológicas es una tarea difícil, no solo por que se necesitan equipamientos 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 a una buena preparación por parte de los toxicólogos, así como el desarrollo de técnicas de laboratorio lo suficientemente sensibles y específicas. Además de contar con los patrones de referencia de las drogas y sus posibles metabolitos. Debido a esta amplia variedad de sustancias que pueden estar presentes en un determinado fluido, se hace casi imposible diseñar un esquema único para el aislamiento y determinación de las mismas.

La fatalidad asociada a la sobredosis de barbitúricos es poco común pero abundan las complicaciones.

Mortalidad; Indicador demográfico que indica el número de defunciones de una población por cada 1000 habitantes durante un periodo determinado generalmente de un año. La fatalidad asociada a la sobredosis de barbitúricos es poco común, pero abundan las complicaciones.

$m=f/p \times 1000$ m= tasa mortalidad f= cantidad de fallecidos p=población total

Morbilidad; Es la cantidad de personas o individuos que son considerados enfermos o que son víctimas de enfermedad en un espacio y tiempo determinado .⁴⁹

La morbilidad incluye neumonía, shock, hipoxia, y coma. A continuación se describen cada uno de ellos.

Neumonía: Inflamación de los alvéolos pulmonares, los diminutos sacos de aire situados profundamente en el interior de los pulmones, donde se producen los intercambios de dióxido de carbono y oxígeno.

Shock: un estado en el cual los mecanismos de transporte que alimentan las células corporales, en especial aquellas que le suministran oxígeno, se deterioran en forma progresiva, provocando una depresión y trastorno en los procesos vitales de la célula y del cuerpo en general.

Hipoxia: en la que el cerebro es privado de oxígeno a pesar de tener un flujo de sangre normal.

Coma: Estado patológico que se caracteriza por la pérdida de la conciencia, la sensibilidad y la motricidad.⁴⁹

III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque las muertes por sobredosis de barbitúricos (accidental, suicida u homicida) son menos frecuentes que en el pasado, no significa que las técnicas para su detección ya sea en muestras decomisadas o en fluidos biológicos estén en desuso. Al contrario, el avance tecnológico ha traído como consecuencia el desarrollo de técnicas y métodos más complejos capaces de detectar cantidades traza de metabolitos originados por el consumo de estas sustancias.

Los equipos se basan en las mismas bases teóricas que permiten realizar diferentes cuantificaciones de concentración de análito. Por lo que se pretende comparar los métodos cualitativos (pruebas presuntivas) con las técnicas instrumentales (pruebas confirmatorias).

Ha sido tal el número de métodos usados en la actualidad para detectar la presencia de barbitúricos, entre otras drogas, que es necesario evaluar ventajas y desventajas de cada una de ellas y determinar cuáles son realmente objetivas, precisas y confiables, para ser usadas de manera confiable en la investigación forense en muertes causadas por ingestión de estas sustancias. Con ello, estaremos proporcionando a las autoridades correspondientes información para seleccionar una herramienta analítica confiable, precisa y objetiva que provea de certeza al analizar una muestra.

VI.- OBJETIVO

Particular

Determinar cuál de los métodos cuantitativos es más confiable, preciso y objetivo para la determinación de barbitúricos en fluidos biológicos.

Generales:

- Describir la farmacología de los barbitúricos.
- Revisar las técnicas y métodos de los métodos cualitativos y cuantitativos para la identificación de barbitúricos.
- Evaluar ventajas y desventajas de los métodos cuantitativo
- Revisar aplicación de los métodos cualitativos y cuantitativos

V.- MARCO TEÓRICO

Los barbitúricos son drogas que actúan como sedantes del SNC, y producen un amplio esquema de efectos, desde sedación ligera hasta anestesia. El ácido barbitúrico se sintetizó por primera vez el 4 de diciembre de [1864](#) por el investigador [alemán Adolf von Bayer](#), (fundador de lo que se convertiría en Bayer chemical. Co). Esto se hizo combinando [urea](#) (un producto de desecho animal) con [ácido malónico](#) (derivado del ácido de las manzanas) compuesto central de todos los barbitúricos, hay varias historias sobre el nombramiento de la sustancia la más factible es que Von Bayer y sus colegas fueron a celebrar su descubrimiento a una [taberna](#) donde los [artilleros](#) de la localidad estaban celebrando el día de Santa Bárbara. El ácido barbitúrico por sí mismo no es farmacológicamente activo, pero los [químicos](#) inmediatamente comenzaron a construir una gran variedad de derivados para usos potenciales como [droga](#). No se le encontró ninguna sustancia de

valor médico, sin embargo, en [1903](#), dos químicos alemanes que trabajaban con [Bayer](#), Emil Fischer y Joseph Von Mering, descubrieron que el barbital era muy efectivo para hacer que los perros se durmiesen. Fischer en 1903 descubre que el barbital es el primer barbitúrico con verdadero efecto hipnoinductor.

En 1904 se comercializó el barbital por Bayer bajo el nombre comercial Veronal, al cual Von Mering denominó Veronal. Se dice que propuso este nombre porque fue el sitio más pacífico que conocía era la ciudad [italiana](#) de [Verona](#). Tanto Fischer como Mering, murieron siendo adictos a su creación, y se cree que por sobredosis de los mismos, ya que a diferencia de otras drogas, el uso continuo de estas no aumenta la cantidad que tolera el cuerpo y resulta letal.

En 1905 el químico Adolph Von Bayer recibió el premio nobel de Química por el descubrimiento del ácido barbitúrico, a partir del cual se extrajeron sustancias sedantes e hipnóticas a las que llamó barbitúricos en honor a su novia de aquella época, Bárbara.

En 1912, Bayer introdujo el fenobarbital, otro derivado del ácido barbitúrico, bajo nombre comercial Luminal, (Fenobarbital) como sedativo-hipnótico.^{43,19}

Los barbitúricos dominaron la escena en la primera mitad del siglo XX, inicialmente con el barbital, y luego desde 1912 con el fenobarbital, aún utilizado en el control de la epilepsia tipo “Grand mal”, y parte de sobredosis mortales que muchos personajes de cierta fama se auto administraron al abusar de esta droga somnífica y combinarla con el indispensable alcohol.

Después de la 2ª Guerra Mundial, entre 1945 y 1954 el fenobarbital fue usado por los médicos alemanes, para aniquilar a los niños que nacían enfermos, o con deformidades físicas de eugenesia.

En los años 50 y los 60, los informes comenzaron a ser publicados alrededor de efectos secundarios y la dependencia relacionada con los barbitúricos.

Los barbitúricos fueron la primera clase de agentes sedantes-hipnóticos conocidos y muy populares, como drogas de abuso en los años 50s. Se calcula que las 3/4 partes de adictos en el mundo las consumían. En los años 70s fueron usados por sectas para fines suicidas.

La intoxicación suicida fue muy frecuente a pesar de lo exigido por el ministerio de Salud Publica la OMS (Serie de informes técnicos, 1956). De hecho los barbitúricos fueron objeto de venta sin control ni restricción, en los Estados unidos.²³

En 1970 la OMS promulgó una ley para sustancias controladas la cual determina las sustancias que se añaden o se eliminan de lista III. Algunos barbitúricos como Amobarbital, Pentobarbital, Secobarbital y Fenobarbital se venden con receta médica.²³

En 1971 se firma el convenio en Viena sobre sustancias psicotrópicas diseñado para regular las anfetaminas, barbitúricos, entre otros grupos.

En la actualidad, los barbitúricos se utilizan comúnmente en el suicidio geriátrico. En un estudio realizado en Nueva York se encontró que el 27.2% de los casos de sobredosis fatales de suicidio en las personas mayores, fue debido a la ingestión de barbitúricos; además, el mismo estudio reveló que lo usaban los adolescentes para contrarrestar el efecto de otras drogas.³⁶

En la actualidad, las benzodiacepinas han remplazado a los barbitúricos en ciertas terapias lo cual ha influido en una baja en el abuso de barbitúricos. Otro factor para esa disminución es el refuerzo de las leyes para restricción de su venta.

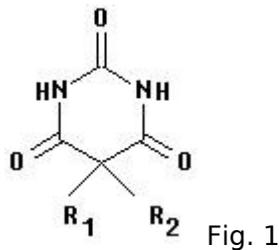
RELACIÓN ESTRUCTURA –ACTIVIDAD DE LOS BARBITURICOS.

Generalidades de los barbitúricos

Los barbitúricos son drogas de origen sintético, que actúan como depresores del Sistema Nervioso Central. (S.N.C.) produciendo efectos benéficos como dañinos estos últimos se derivan del exceso o el mal uso de los barbitúricos, están centrados principalmente en el sistema nervioso central, actúan como sedantes del SNC y, por virtud, producen un amplio esquema de efectos, desde sedación suave hasta anestesia y dependiendo de las dosis, a las funciones sensoriales y al sistema respiratorio, es muy fácil llegar a alcanzar el grado de síndrome toxico, el tratamiento para suprimir este tipo de afecciones es de ir dejándolo de manera paulatina, nunca de golpe, también es vital el buen funcionamiento de los riñones, ya que la mayor parte de barbitúricos se eliminan por la orina, y el órgano más importante para eliminarlos es el hígado.⁴²

Se ingieren o se inyectan, su presentación farmacéutica puede ser en tabletas o cápsulas. Estas drogas que calman el sistema nervioso son susceptibles de crear adicción. Las personas que trabajan en la noche las emplean para dormir durante el día, se sienten indispuestas al despertarse. Para reanimarse, recurren a las drogas o estimulantes. Existen alrededor de un medio centenar de esos hipnóticos, que difieren entre sí sólo por la rapidez y duración de su acción. Entre ellos se encuentran el Seconal y Fenobarbital.

Estructura general y propiedades químicas de los barbitúricos



Su nombre IUPAC es 2, 4, 6,-1H, 3H, 5H- Pirimidintriona Fig. 1⁸

El ácido barbitúrico es un compuesto orgánico basado en la estructura de la pirimidina es un ácido débil con un $pK_a = 7,3$.

El grupo carbonilo en la posición 2 adopta el carácter ácido a causa de la tautomerización (ceto-enol), que se ve favorecido por su localización entre los dos nitrógenos amido electronegativos. La forma enol se favorece en solución alcalina, y se producen sales. Los barbitúricos en los que el oxígeno del C 2 es sustituido por azufre se denominan tiobarbitúricos (tiobarbitúratos). Estos compuestos son más liposolubles que los oxibarbitúricos correspondientes. En general, los cambios estructurales que incrementan la solubilidad en lípidos disminuyen la duración de la acción y la latencia para el inicio de la actividad, aceleran la degradación metabólica y en muchos casos incrementan la potencia hipnótica.

Estructura química y actividad farmacológica:

Cuando los grupos sustituyentes son cadenas cortas y saturadas o aromáticas se obtienen barbitúricos de acción prolongada, como el fenobarbital (fenil etil malonilurea). Fig.2⁹

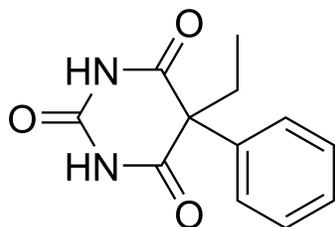


Fig.2

Nombre según la IUPAC 5-etil 5-fenil 1,3 diazinano-2, 4, 6-triona.

Este compuesto carece de actividad depresiva central, pero la presencia de grupos alquilo o arilo en la posición 5 le confiere actividades sedantes hipnóticas y, en ocasiones de otros tipos.

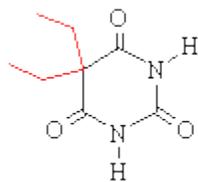
Para que los barbitúricos tengan un efecto depresor del SNC, es esencial que los hidrógenos en la posición 5 sean sustituidos por radicales alquílicos, alicíclicos, o arílicos. La potencia y la duración de acción dependen de la longitud, ramificación, instauración de las cadenas laterales. A mayor longitud, mayor potencia depresora pero menor duración de acción.^{8,9}

Cuando las cadenas sustituyentes tienen gran longitud e instauración o son alicíclicas, se obtienen barbitúricos de acción rápida; pentobarbital (etil-metil butil malonilurea), ciclobarbital. Si se incrementa la liposolubilidad de la molécula haciendo reaccionar la tiourea con el ácido málico o se introducen grupos metilos en posición 1 en los derivados de acción rápida, se obtienen los derivados de acción ultrarrápida o ultracorta, útiles como anestésicos generales intravenosos.^{3, 8.} Todos los barbitúricos son pocos solubles en agua, más solubles en alcohol, éter, cloroformo. Los barbitúricos de acción ultracorta son muy liposolubles, distribuyéndose rápidamente por el SNC y posteriormente al resto de los tejidos. Administrados por vía parenteral, su efecto comienza inmediatamente y tiene una duración inferior a una hora; por lo que tienen un papel predominante en anestesia. Ejemplos son: Tiopental, hexobarbital, metoxibarbital.

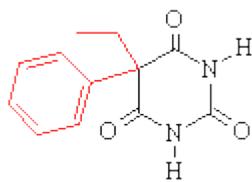
Los barbitúricos de acción intermedia o corta, tienen una liposolubilidad intermedia y se usan como ansiolíticos y sedantes pre quirúrgicos. Su efecto aparece entre los 15-40 min, después de la toma y su duración del efecto es de 8 hrs.

Los de acción prolongada, son relativamente poco liposolubles y se usan principalmente como anticonvulsivos, sus efectos aparecen dentro de la primera hora y sus efectos se prolongan hasta 12 hrs. Ejemplos son: Barbital y metabarbital^{25.}

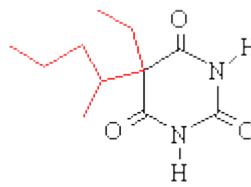
Estructuras químicas de algunos barbitúricos a) acción larga ej. Barbital, y fenobarbital. Fig. 3²⁹



Barbitol(acción prolongada
(Veronal)



Fenobarbital
(Luminal)



Pentobarbital acción rapida
(Nembutal)

Fig.3

Síntesis de barbitúricos

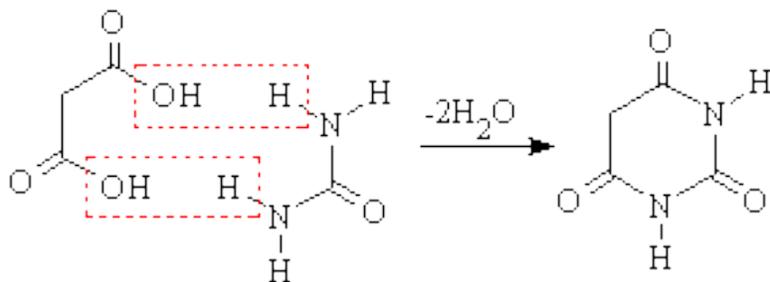


Fig. (4)

Ac. Malónico Urea

Ac.barbitúrico 2, 4, 6-(1H, 3H, 5H) Pirimidintriona

Los barbitúricos son compuestos resultantes de la reacción de una molécula de urea, con una de ácido malónico, se eliminan dos moléculas de agua, obteniendo el anillo de la malonilurea ó ácido barbitúrico, que carece de actividad depresora central, pero la presencia del grupo alquilo o arilo en la posición 5 le confiere actividades sedantes hipnóticas⁴⁶

Su nombre IUPAC es 2, 4, 6,-1H, 3H, 5H- Pirimidintriona es un ácido débil con un pka= 7,3. (Fig.4)⁴⁶.

FARMACOLOGÍA DE BARBITURICOS:

Tabla I Clasificación en función de su tiempo de Acción farmacológica: ⁴⁴

<u>I- ACCIÓN ULTRACORTA</u> Tiopental. Metohexital.
<u>II- ACCIÓN CORTA</u> Hexobarbital. Pentobarbital. Secobarbital.
<u>III- ACCIÓN INTERMEDIA</u> Amobarbital. Aprobarbital. Butabarbital.
<u>IV- ACCION PROLONGADA</u> Barbital. Fenobarbital. Primidone.

Los barbitúricos de acción ultracorta:

- Producen anestesia dentro del minuto de haberse administrado intravenosamente.

Por su parte los barbitúricos de acción corta o intermedia de categoría III, se caracterizan por:

- Después de la administración oral, la acción inicia entre los 15-40 minutos.

- La duración del efecto permanece hasta 6 horas, estas drogas se utilizan principalmente para el insomnio y son sedantes pre-quirúrgicos. Los veterinarios utilizan el pentobarbital como anestesia y eutanasia.

En cambio los barbitúricos de acción prolongada son poco liposolubles y se caracterizan porque:

- Los efectos de estas drogas se inician alrededor de una hora y su duración se prolonga por 12 horas. aproximadamente, y se utilizan principalmente como sedantes diurnos, y en tratamiento para desordenes cerebrales en epilepsia.
- Presenta efecto anticonvulsivo: Mefobarbital, Metabarbital, Fenobarbital, Amobarbital, Pentobarbital, (únicamente parenteral).
Poseen efecto sedantes-hipnótico: Amobarbital, Aprobarbital, Butabarbital, Pentobarbital Secobarbital, Fenobarbital (parenteral únicamente).⁴⁴

Farmacocinética

Absorción

Se absorben bien por vía oral, a nivel de tramos altos de intestino delgado (mejor en forma de preparaciones liquidas que en forma de capsulas o comprimidos). Distribuyéndose ampliamente por todos los tejidos y fluidos alcanzando altas concentraciones en el cerebro, hígado y riñones.

La absorción por vía rectal es irregular. Las sales sódicas de los barbitúricos son irritantes (la alcalinidad produce necrosis locales) cuando se administran por vía subcutánea o intramuscular.

La vía intravenosa. Se utiliza fundamentalmente para urgencias convulsivas. Se absorben mejor las sales sódicas que los ácidos libres correspondientes y más si se ingieren con el estómago vacío. El alcohol aumenta el grado de absorción quizá porque aumenta la circulación sanguínea superficial a nivel de la mucosa gástrica.

Uno de los factores más importantes de la acumulación cerebral de los barbitúricos es su grado de liposolubilidad. Así los muy liposolubles como el tiopental, metohexital, amital, hexcobarbital cruzan rápidamente la barrera hematoencefálica.

Se absorben bien desde el tracto gastrointestinal, apareciendo niveles en sangre, y los primeros síntomas 30 minutos después de la ingestión, alcanzando su efecto máximo a las 4 horas. La presencia de alimentos en el estómago disminuye la velocidad de absorción, aunque no disminuye la absorción total. En cuanto a su fijación de proteínas plasmáticas, es baja entre el 5-20%, para los barbitúricos de acción lenta e intermedia, y superior al 35% para los de acción

corta o ultracorta. Finalmente, en relación con el grado de ionización, si el pH de la sangre aumenta por encima de la constante de disociación (pka) de la droga ingerida, la concentración plasmática de la droga no disociada disminuye y tiene lugar un aumento de flujo de la misma desde el tejido al plasma. El túbulo renal permite la reabsorción de la mayor parte de drogas liposolubles y resulta sólo permeable para la droga no disociada. Esto tiene implicaciones terapéuticas, dado que la manipulación del pH urinario podría favorecer una mayor depuración del tóxico por vía renal, Así en el caso del fenobarbital, al ser el pka=7.3, la alcalinización aumentara la cantidad de droga ionizada. El volumen de distribución de los barbitúricos oscila entre 0.6 del fenobarbital, y 2.6 mg/ kg del tiopental. La eliminación depende del grado de liposolubilidad. Los menos liposolubles son excretados por la orina, Se distribuyen por difusión a todos los tejidos según su liposolubilidad, pH del medio y grado de fijación a las proteínas tisulares. La acidificación del plasma favorece la penetración en el sistema nervioso, atraviesan la barrera placentaria y se hallan en la leche. La duración de su acción está influida por los procesos de redistribución desde el cerebro a los tejidos, con ulterior acumulación a los más ricos en grasa²²

Distribución

Se distribuyen ampliamente por todos los tejidos y fluidos, alcanzando altas concentraciones en cerebro, hígado, y riñones, siendo su buena liposolubilidad uno de los factores más importantes que explican su acumulación cerebral. Los barbitúricos más liposolubles se distribuyen ampliamente alcanzando los sitios menos irrigados del SNC y tejidos tales como el musculo, piel o grasa. La mayoría de los barbitúricos atraviesan la barrera hematoencefalica, lo cual explica los picos de concentración cerebral en pocos minutos. Por otra parte los menos liposolubles requieren mucho más tiempo para alcanzar picos plasmáticos en sangre cerebral. Su unión a proteínas plasmáticas es muy variable, desde un 75-80% para el pentotal, y un 5% barbital ²²

De este modo pueden alcanzarse picos de concentraciones cerebrales en pocos minutos. Otro factor importante para su distribución en el SNC es la unión a proteínas plasmáticas esta es muy variable dentro del grupo farmacológico, variando por ejemplo desde un 75-80% para el pentotal, 65-80% para el tiopental, hasta solo un 5% para barbital.

Los barbitúricos muy liposolubles se distribuyen ampliamente llegando hasta los lugares menos irrigados del SNC y a otros tejidos tales como el músculo, piel o grasa.

Por otra parte, los menos liposolubles requieren mucho más tiempo para alcanzar picos plasmáticos en sangre cerebral, incluso después de ser administrados por vía intravenosa.

Así mientras que el fenobarbital o barbital tardan al menos de 5- 15 minutos para producir su máxima depresión del SNC tras ser infundidos por vía vía intravenosa, la administración por esta misma vía de pentobarbital o secobarbital casi provoca efectos inmediatos. Las concentraciones plasmáticas caen rápidamente en función de esa rapidez de (re)distribución de los barbitúricos muy liposolubles, no dependiendo de la rapidez de su metabolismo.²²

Biotransformación:

El organismo tiende a eliminar sustancias extrañas a través del riñón, para esta eliminación no existe problema cuando se trata de sustancias hidrosolubles o muy disociadas. Si lo hay, en cambio con las liposolubles, y ello por una doble razón:

1. Porque, cuando son eliminadas por el riñón, encuentran en el túbulo una membrana biológica y se reabsorben.
2. Porque para estas sustancias existiría una fijación tisular reversible, toda vez que siempre encontrarán una barrera biológica en la que se disolverán, volviendo a penetrar en la célula.

El ser vivo está rodeado de un manto lipídico impermeable, cuya misión es mantener el medio interno. De este modo, las sustancias liposolubles jamás podrán salir del organismo.

La biodegradación tiene como principal objetivo introducir una serie de modificaciones químicas en la molécula, que la transformen de liposolubles a hidrosolubles. Por otra parte el metabolito engendrado suele ser menos activo desde el punto de vista toxicológico, contribuyendo de este modo a la detoxificación. Este descenso de la toxicidad de los metabolitos no siempre se produce. Las enzimas que intervienen en estos mecanismos se encuentran principalmente localizadas en el hígado, aunque pueden estar presentes en menor concentración, en otros órganos riñón, pulmón, intestino y cerebro. Con excepción del aprobarbital y el fenobarbital que son menos liposolubles, el metabolismo casi completo, con conjugación o sin ella, de los barbitúricos en el hígado

procede a su excreción renal, la oxidación de los radicales al nivel de C5, es la biotransformación más importante que produce la terminación de la actividad biológica⁴⁷

- Oxidación de las cadenas laterales R1 y R2 colocadas en posición 5 da por resultado formación de alcoholes, cetonas, fenoles, o ácidos carboxílicos que pueden aparecer en la orina como tales o como conjugados del ácido glucorónico.
- Desulfuración de los tiobarbitúricos que pasan a oxibarbitúricos.
- Eliminación de los grupos alquílicos de los átomos de nitrógeno.
- Apertura hidrolítica del anillo del ácido barbitúrico.
- N-metilación. En posición 1 ó 3 disminuye, la ionización, aumenta la liposolubilidad e incrementa la potencia depresora central. Pero si se introducen grupos alquílicos en posición 1 y 3 aparecen efectos convulsionantes.
- Conjugación glucurónica una vía metabólica importante por ejemplo (fenobarbital). Los productos polares resultantes suelen ser inactivos. Algunos barbitúricos producen metabolitos activos. Fundamentalmente tras N-metilación o desulfuración. En general los oxibarbitúricos se metabolizan en el hígado, mientras que los tiobarbitúricos se pueden metabolizar en riñón o cerebro.
- El hígado hidroliza un 60-75% de la dosis absorbida de fenobarbital. Cerca de 25% del fenobarbital y casi todo el aprobarbital se excretan sin cambios por la orina. Su eliminación renal se puede incrementar en gran medida mediante diuresis osmótica, alcalinización de la orina o ambos métodos. La eliminación metabólica de los barbitúricos es más rápida en las personas jóvenes que en ancianos y en lactantes, y las vidas medias se incrementan durante el embarazo, en parte por el volumen ampliado de la distribución. En muchos casos la hepatopatía crónica en particular la cirrosis, aumenta la vida media de los barbitúricos biotransformables. la administración repetida, en especial de fenobarbital, acorta la vida media de los barbitúricos que se metabolizan como consecuencia de inducción de enzimas microsomales.^{8, 11, 22, 40.}

Eliminación

La mayoría de los barbitúricos son ampliamente biotransformados a metabolitos inactivos por el sistema de hidroxilación hepática, algunos son biotransformados lentamente. Alrededor del 20% de fenobarbital es convertido a p-hidroxifenobarbital y excretado en orina por un periodo de 5 días, el 15-20% se elimina intacto. La vida media plasmática de fenobarbital es de 86 hrs.⁸

La eliminación se produce fundamentalmente por el riñón, aunque una pequeña cantidad puede hacerlo también por las heces, todos los barbitúricos se filtran en el glomérulo renal en proporción a su concentración plasmática. Una parte puede reabsorberse tubularmente.

La eliminación renal es menor para los barbitúricos liposolubles no ionizados, por otro lado el barbital y otros barbitúricos pocos solubles se eliminan en gran proporción por la orina sin metabolización previa, pero de manera lenta. Así ocurre también con una proporción suficientemente significativa de fenobarbital y aprobarbital (7-18%) que puede llegar de un 25-50% de la dosis administrada de fenobarbital.

El metabarbital llega a eliminarse de este modo hasta un 60-90% .La eliminación renal puede incrementarse de manera importante mediante una diuresis osmótica, la alcalinización de la orina también puede favorecer esta eliminación renal de varios barbitúricos y de manera especial aquellos con valores relativamente bajos de pka.

La eliminación depende del grado de liposolubilidad. Los menos liposolubles son excretados por la orina sin grandes modificaciones, mientras que el resto sufre una degradación hepática que lo transforma en compuestos cada vez menos activos y más polares, que son finalmente eliminados por el riñón.

Eliminación lenta: fenobarbital, barbital activos de 8 a 10 h.

Eliminación rápida: secobarbital, hexobarbital activos de 3 a 6 hrs. si los grupos sustituyentes tienen mayor longitud o son insaturados, resultan los derivados de acción intermedia alobarbital (dialil malonilurea), amobarbital, (etil isopentil malonilurea).²²

Tabla II Características Farmacocinéticas de los Barbitúricos comúnmente prescritos⁴³

Fármaco	Semivida (Hrs)	Aparición de efectos	Duración de Acción	Unidas a Proteínas %	Volumen de Distribución	Concentración Plasmática	PKA
LARGA ACCIÓN							
FENOBARBITAL	53-118	2-3H	>6H	40-51	0,88+-0,33	10-12	7,2
METABARBITAL		≥1H	>6H			10-12	8,5
METOBARBITAL	48-52	≥1H	>6H	48-60	2,6	10-12	7,8
BARBITAL	48	6-12H	25	0,4-0,6	7,8		
MEDIA ACCIÓN							
AMOBARBITAL	16-40	45-60MIN	3-6H	40-60	0,9-1,4	6-8	7,9
APOBARBITAL	14-34	45-60MIN	3-6H	55-70	0,6-0,7	6-8	8,1
BUTABARBITAL	40-140	45-60MIN	3-6H	26		6-8	7,9
SECOBARBITAL	15-40	30-60MIN	3-6H	46-70	1,6-1,9	6-8	7,9
CORTA ACCIÓN							
PENTABARBITAL	15-50	10-15MIN	30MIN	65	0,5-1,0	3-4	7,9

TIOPENTAL	3-8		30MIN	65-80	1,4-6,7	3-4	7,6
HEXOBARBITAL	3-6		3H	42-52	1,1-0,1		
METHOHEXITAL	1,2		3H	73	1,1		7,9

Los barbitúricos de larga duración tienen una vida de eliminación mayor a 40 hrs. su aparición de efecto oscila entre 1 hasta 6 hrs. se unen a proteínas plasmáticas entre 0.4-50%, y con su pka que oscila entre 7.2 y 8.5 esto está relacionado a su efecto de acción ya que a mayor pka mayor acción. Son menos liposolubles, se acumulan más lentamente en los tejidos y son excretados más rápidamente por el riñón como una droga activa. A propósito la excreción urinaria cuenta para el 20-30% de la eliminación del fenobarbital

Los de acción media tienen eliminación de vida media de menos de 40 horas, el inicio de sus efectos comienza a partir de 30-60 minutos después de la ingesta y el tiempo de acción es a partir de 3 hasta 6 hrs. con un pka de 7.9

Corta acción. Su tiempo de semivida es de 1-15 horas, la aparición de los efectos es a partir de 10-15 minutos. Son más liposolubles, más enlaces a proteínas, mayor pka, mayor velocidad de acción y más corta duración y se metabolizan en su totalidad en el hígado para inactivar metabolitos (los cuales son excretados como glucorónidos en la orina).⁵¹

Las semividas de los diferentes barbitúricos son variables (tabla II), la semivida de los barbitúricos se incrementan con la edad, la enfermedad hepática y la insuficiencia renal grave (en el caso del fenobarbital). Por el contrario la semivida de todos ellos disminuye con la administración crónica.⁴³

- Semivida de eliminación (T_{1/2}) Es el tiempo necesario para que la concentración de fármaco en sangre disminuya a la mitad, una vez finalizada la absorción y distribución.

FARMACODINAMIA:

Mecanismo de acción de los barbitúricos

Los barbitúricos se unen a un sitio específico en los canales iónicos sensibles al ácido gamma-aminobutírico (GABA) encontrados en el Sistema Nervioso Central, donde permiten la entrada de cloruro a las membranas celulares y, subsecuentemente, hiperpolariza la neurona postsináptica. GABA es el mayor neurotransmisor inhibitorio del Sistema Nerviosos Central. Los barbitúricos producen corrientes de cloruro mediado por el GABA al unirse al complejo receptor $GABA_A$ -ionoforo e incrementando la duración de la apertura del ionoforo: los barbitúricos inhiben la despolarización neuronal al potenciar y prolongar las acciones de GABA. En altas dosis los barbitúricos estimulan los receptores $GABA_A$ directamente en la ausencia del GABA. Los barbitúricos también bloquean los receptores de glutamato (neurotransmisor excitatorio) en el SNC.⁴⁵

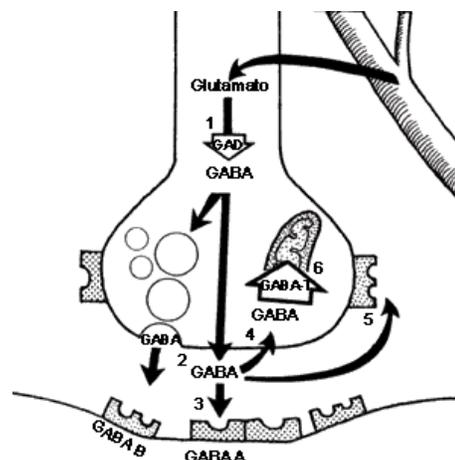


FIG. 5 Mecanismo de Acción Gaba⁴⁵

Uno de los receptores afectados por el GABA es el receptor GABA_A, este receptor controla un canal del cloro y su excitación produce la entrada de iones cloro, este proceso aumenta la concentración de cargas negativas en el lado interno de la membrana celular: la hiperpolariza y hace menos probable la propagación de un potencial de acción por lo tanto el GABA ejerce su efecto inhibitor disminuyendo la frecuencia de descarga de una neurona. Los barbitúricos aumentan directamente la entrada de iones cloro, causando el mismo efecto del GABA⁴⁵.

Efectos farmacológicos

Los efectos de los barbitúricos se pueden clasificar en terapéuticos y tóxicos. La presencia de los mismos está en función de la dosis administrada. De manera general su acción principal es la depresión del sistema nervioso central (SNC), produciendo sedación e hipnosis además de anestésica general, usados en diferentes aplicaciones terapéuticas. Como efecto tóxico tenemos la depresión respiratoria seguida de paro cardíaco y muerte.

Los efectos de los barbitúricos: en pequeñas dosis son calmantes y relajan los músculos. En dosis mayores pueden ocasionar entorpecimiento del habla, torpeza al caminar, mal funcionamiento y reflejos lentos e inciertos; también un sueño profundo con dificultad al despertar, y mal humor. Sin embargo, en caso de intoxicación aguda por barbitúricos sobrevienen, déficit importante en las funciones cardiovasculares y periféricas de otras clases.

Se utilizan principalmente para tratamientos médicos como epilepsia, son depresores del sistema nervioso central, sus sustancias activas son: fenobarbital, Pentobarbital, Amobarbital.¹¹

Efectos terapéuticos

Las principales acciones farmacológicas de los barbitúricos se llevan a cabo sobre el SNC o el hígado, aunque a dosis terapéuticas pueden tener pequeños efectos sobre músculo esquelético, cardíaco o liso. A dosis superiores, estos efectos musculares pueden incrementarse dando lugar a importantes manifestaciones sistémicas. Sobre el SNC los barbitúricos, dependiendo de la dosis administrada, afectan todos los niveles. Al actuar sobre el tálamo disminuyen la excitabilidad de las membranas pre sinápticas y post sinápticas, produciendo un desequilibrio entre los mecanismos inhibitorios y excitadores, e influyendo a la corteza cerebral y a la formación

reticular ascendente. Producen todos los grados de depresión del SNC, desde la sedación leve, hipnosis o sueño, anestesia general hasta la muerte, conforme se incrementa la dosis. El tiopental es el barbitúrico de mayor uso durante la anestesia general.^{2,3}

Normalmente, producen disminución de la ansiedad, anestesia, (a dosis elevada), sueño, depresión de la corteza sensorial y disminución de la actividad motora. Las dosis no anestésicas preferentemente suprimen las respuestas post sinápticas. La facilitación de la transmisión disminuye y la inhibición por lo general aumenta a nivel post sináptico, en el caso de las células piramidales cerebelares, corticales y del núcleo cuneiforme, de la sustancia nigra y las neuronas de relevo talámicas; o bien pre sináptico como en la médula espinal. Más aún, la inhibición solo ocurre en la sinapsis, donde la neurotransmisión está mediada por el GABA¹¹. A continuación se describen sus principales efectos en los diferentes aparatos de nuestro organismo:

Sistema Nervioso Central.

Los barbitúricos deprimen con carácter reversible la actividad de todos los tejidos excitables el SNC es particularmente sensible e incluso cuando se administra en concentraciones anestésicas, son débiles los efectos directos sobre los tejidos periféricos excitables. Algunos de ellos, en particular los que contienen un sustitutivo 5 fenil (fenobarbital, mefobarbital), poseen actividad anticonvulsiva selectiva. Sus propiedades contra la ansiedad no son equivalentes a las ejercidas por las benzodiazepinas, sobre todo con respecto al grado de sedación que se produce. Los barbitúricos pueden tener efectos eufóricos. Salvo por las actividades anticonvulsivas del fenobarbital y sus congéneres, en los barbitúricos la selectividad y el índice terapéutico son bajos. En algunos individuos y en ciertas circunstancias, como en presencia del dolor. Los barbitúricos causan excitación manifiesta en vez de sedación. El hecho de que ocurra esta excitación paradójica con otros depresores del SNC sugiere que pueda deberse a depresión de los centros inhibidores.²²

Los barbitúricos se disuelven con facilidad en la [grasa](#) del organismo. Entonces están preparados para traspasar la [barrera hematoencefálica](#) y alcanzar el [cerebro](#). Una vez en el cerebro, los barbitúricos actúan impidiendo el flujo de iones de [sodio](#) entre las [neuronas](#), a la vez que favorecen el flujo de iones de [cloruro](#). Ambas acciones concluyen en un obstáculo definitivo para los potenciales de acción.⁴²

Los barbitúricos producen los siguientes efectos:

- A dosis bajas producen sensación de tranquilidad y ayudan a conciliar el sueño.
- A dosis altas, disminuyen los reflejos y provocan disminución en la frecuencia respiratoria que puede llevar hasta el coma y la muerte.

Con el uso prolongado aparecen alteraciones que van desde la anemia, hepatitis, depresión, falta de coordinación motora, y dificultad para el habla. (Efectos tóxicos).

- Efecto sedante (tranquilizante).
- Hipnótico (produce sueño), se utilizan para tratar el insomnio nervioso severo.
- Anticonvulsivo en el tratamiento de epilepsia.
- Anestésico algunos de ellos se pueden emplear para disminuir los niveles de ansiedad de un paciente después de una cirugía

Los barbitúricos lipofílicos, tales como el tiopental, causan anestesia rápida por su tendencia a penetrar en el tejido cerebral rápidamente. Los barbitúricos son todos anticonvulsivos ya que hiperpolarizan las membranas celulares; y por ende son eficaces en el tratamiento de la epilepsia.

Efectos Pulmonares

Los barbitúricos pueden causar depresión del centro medular respiratorio e inducir a la depresión respiratoria. Los pacientes con enfermedades crónicas de obstrucción respiratoria son más susceptibles a estos efectos, inclusive en dosis que serían consideradas terapéuticas en individuos sanos. La fatalidad por sobredosis es generalmente secundaria a la depresión respiratoria.⁴⁶

Efectos Cardiovasculares

La depresión cardiovascular puede darse por la depresión de los centros medulares vasomotores; pacientes con falla congestiva cardíaca son más susceptibles a estos efectos. En altas dosis, la contractilidad cardíaca y el tono vascular quedan comprometidos, lo que puede resultar en el colapso cardiovascular.^{11, 46}

Efectos en la etapa del sueño

La dosis hipnótica de barbitúrico incrementa, el tiempo total del sueño y alteran las etapas de este de una manera dependiente de la dosis. Al igual que las benzodiazepinas, estos fármacos disminuyen la latencia del sueño, el número de despertares y las duraciones del sueño. Durante la administración nocturna repetitiva sobreviene cierta tolerancia a los efectos en el sueño en plazo

de unos cuantos días y el efecto en el tiempo total de sueño se puede reducir hasta 50% después de dos semanas de utilización. La interrupción produce incrementos de rebote de todos los aspectos que, según se ha informado, disminuyen los barbitúricos.⁴⁶

Tolerancia. Puede ocurrir tolerancia tanto farmacodinamia (funcional) como farmacocinética, la primera contribuye más al efecto disminuido que la segunda. Con la administración prolongada de dosis gradualmente crecientes sigue creándose tolerancia farmacodinamia durante un periodo de semanas a meses, según el programa de dosificación en tanto que la tolerancia farmacocinética alcanza su máximo en unos cuantos días a una semana, la sedación y la hipnosis se producen con mayor rapidez, y es de mayor magnitud que a los efectos anticonvulsivos y letales;

Por tanto, conforme se incrementa la tolerancia, disminuye el índice terapéutico. La tolerancia farmacodinamia a los barbitúricos confiere tolerancia a todos los depresores (depresivos) del SNC, entre ellos el etanol.⁴⁶

Consumo excesivo y dependencia:

Riesgos; Las dosis excesivas es un factor en las muertes ocasionadas por suicidios y envenenamientos accidentales con drogas. A veces ocurren muertes accidentales cuando la persona toma una dosis, sufre confusión, y sin pretenderlo toma dosis adicionales o mayores. Con los barbitúricos hay menos diferencia entre la cantidad que produce sueño y la que produce la muerte. Entre otros efectos podemos mencionar la fatiga, dolores de cabeza, vértigo, angustia, fiebre y trastornos gastrointestinales son propios de la intoxicación crónica de esos hipnóticos que igualmente causan trastornos cerebrales, los barbitúricos crean dependencia, las personas muestran un marcado deseo de continuar consumiendo la droga y aumentar la dosis. Para obtener una sensación de euforia y relajación. Esto ocurre porque se crea la dependencia física y la psíquica, con un número mayor de víctimas entre las mujeres, lo cual explica que los barbitúricos sean expendidos con recetas médicas.⁴²

Dependencia a los barbitúricos (Organización Mundial de la Salud (OMS)).

De acuerdo a los criterios de la OMS, la dependencia del tipo barbitúrico es un estado provocado por la administración repetida de un barbitúrico o de un agente de efectos similares a los barbitúricos, en forma continua y por tanto común en dosis superiores a las terapéuticas. Las principales características de la dependencia barbitúrica son:

- 1) Un vehemente deseo o necesidad de seguir tomando la droga; esa necesidad puede ser satisfecha por la droga tomada inicialmente o por otra de propiedades semejantes a la de los barbitúricos.
- 2) Una tendencia a aumentar la dosis debida en una parte a la aparición de tolerancia.
- 3) Una dependencia psíquica respecto a los efectos de la droga, relacionada con la aparición subjetiva e individual de esos efectos.
- 4) Una dependencia física respecto a los efectos de la droga, que requiere de la presencia de esta para el mantenimiento de la homeostasis y que da lugar a un síndrome de abstinencia bien definido, característico y de curso constante al suprimirse la administración. El síndrome de abstinencia es el rango más característico y peculiar de la dependencia de tipo barbitúrico. Se inicia durante las 24 hrs siguientes a la supresión de la droga, alcanza su máxima intensidad a los dos o tres días y desaparece lentamente, no se conoce por ahora ningún agente capaz de precipitar un síndrome de abstinencia barbitúrica sin necesidad de interrumpir la administración de la droga. Los síntomas que constituyen el síndrome de abstinencia, clasificados por orden de aparición son los siguientes; Angustia, sacudidas involuntarias, temblor intencional en manos,

vómitos, insomnio, pérdida de peso, descenso brusco de tensión arterial, cuando el sujeto esta de pies; pueden presentarse convulsiones y un estado delirante como Delirium tremens.³⁷

Efectos Tóxicos

Sintomatología

Las personas con sobredosis de sedantes hipnóticos pueden manifestar síntomas de confusión, apnea, ataxia y dificultad respiratoria ampollas en pies y manos, gran parte de la toxicidad se relaciona con la acumulación de metabolitos que tienen un periodo de vida prolongado; las dosis altas o masivas producen junto con la inhibición de los sentidos [coma], alteración profunda de las funciones vegetativas, depresión respiratoria esta intoxicación produce narcosis, que evoluciona al coma en casos graves se puede dividir esta sintomatología en tres periodos. ⁶

- ♥ **Primer periodo;** se presenta un corto periodo de latencia entre la ingestión y la aparición de los primeros síntomas, con tiempo más o menos de treinta minutos, se presenta la llamada embriaguez barbitúrica: el paciente se torna extraño, incoherente, con periodos de excitación psicomotriz, cefalea y pérdida del equilibrio. Los síntomas gástricos se manifiestan en nauseas, vómito, y fuerte dolor epigástrico. Con todos estos síntomas pueden estar ausentes, y el paciente entrar en coma inmediato.
- ♥ **Segundo periodo;** generalmente es de coma profundo, con diferentes variaciones, Este coma es flácido, con relajación muscular, el paciente presenta hipo o irreflexia, En extremidades, el reflejo corneal esta abolido, puede haber miosis o midriasis, la ocurrencia de miosis inicial es indicio de coma grave. Respiración lenta y profunda. Hay fiebre entre el segundo y tercer día entre 39-40°C que es de origen central, en coma grave se presentan trastornos de la termorregulación con hipotermia, en el coma leve se pude presentar hipotensión, taquicardia o arritmia, En lo nefrológico presencia de oliguria que puede llegar a anuria.

- **El tercer periodo;** Hay coma fatal, presentándose la muerte dentro de un periodo de doce a dieciséis horas, el fallecimiento es causado por edema agudo del pulmón (neumonía)^{2,3}.

Dosis letal de los barbitúricos son las siguientes:

Dosis tóxica: es aquella que produce algún efecto dañino en nuestro organismo.

Dosis letal (DL): es aquella que produce la muerte del individuo, la dosis letal no es la misma para todos los individuos, así dada una población de n individuos objeto de estudio, distinguimos:

- Dosis letal 50 (DL50): aquella dosis que produce la muerte del 50% de la población. (mg/kg).
- Dosis letal mínima (DLM): Es la dosis más baja que ha producido la muerte de un individuo, el tiempo es un factor importante en la actuación del tóxico en el organismo.
- Tiempo de latencia: Desde la ingestión de la dosis hasta que aparece el efecto tóxico pasa un determinado tiempo en el que no aparece ningún síntoma de intoxicación
- Tiempo letal: es el tiempo que transcurre desde la ingestión de la dosis hasta que se produce la muerte del sujeto.
- Tiempo letal 50 (TL 50): es el tiempo que transcurre hasta que el 50% de los individuos mueren.

La dosis tóxica varía para cada compuesto, pudiendo darse como dosis letal media (adulto) entre 3 y 6 gramos aproximadamente.⁴⁹

- Barbitúricos de acción rápida: Secobarbital 3 g
Pentobarbital. Concentración plasmática letal de 3.5mg. %
- Barbitúricos de acción intermedia: Amobarbital y Butobarbital no se conoce la dosis letal. Concentración plasmática letal de 5.5mg. %
- Barbitúricos de acción prolongada: Barbital.DL10 g.
Concentración plasmática letal de 15mg. %³
Fenobarbital; DL 5g.

Concentración plasmática letal de 9 mg. %³

Curva dosis-respuesta barbituricos y benzodiazepinas

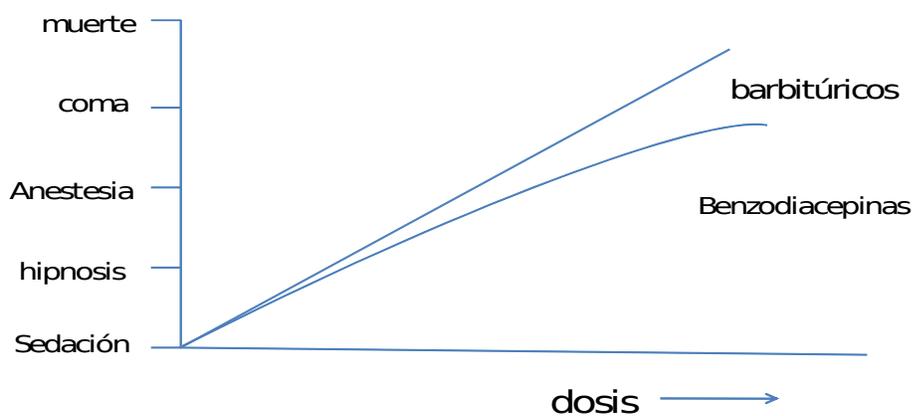


Fig. 6 Comparación curva dosis respuesta barbitúricos Vs benzodiazepinas.⁵⁰

Los barbitúricos tienen una curva dosis respuesta lineal, que progresa de la sedación a depresión respiratoria y muerte.⁵⁰

ASPECTOS MÉDICOS LEGALES EN CASOS DE MUERTE POR BARBITÚRICOS.

Aunque las muertes por ingestión de barbitúricos actualmente no son de alta prevalencia en las intoxicaciones medicamentosas, si llegan a ocurrir. Cualquier tipo de intoxicación tiene implicaciones médico-legales, ya que no puede deducirse *a priori* qué responsabilidad encierra, tanto en las intoxicaciones voluntarias como en las accidentales. Ello condiciona el que ante una intoxicación deba extenderse siempre una parte judicial narrando los hechos. El médico emitirá un dictamen o informe donde asentará los síntomas que indican como causa directa a los barbitúricos, síntomas característicos como son; color de piel rosada, contracción muscular, espasmos, etc. La muerte por sobredosis de barbitúricos puede ser debido a las siguientes causas:

Intoxicaciones accidentales:

Las principales variedades de intoxicaciones medicamentosas son:

- 1.- Accidentes medicamentosos puros. Surgen de forma casual, aún a pesar de ser correcta la indicación, la dosis y la vía de administración.
- 2.- Accidentes medicamentosos por auto-prescripción, suelen tener por origen el desconocimiento de los efectos secundarios de estas sustancias y sus posibles acciones al ser administradas simultáneamente con otras.
- 3.- Errores en la administración de medicamentos, Pueden ser debidos al médico, al farmacéutico, al familiar que se encarga de su cuidado o incluso al propio enfermo.
- 4.- Incompatibilidades con otras terapéuticas, que en la mayor parte de los casos pueden unirse a los casos incluidos en los grupos 2 y 3.

5.- Intoxicaciones accidentales en los niños, encuentran su origen en la imprudencia de los padres que no toman las medidas adecuadas de protección. En este sentido presentan especial importancia las llamadas intoxicaciones de mesilla de noche, por ser este el lugar habitual de depósito de los medicamentos, perfectamente asequibles a los niños. Entre las circunstancias que favorecen los accidentes tóxicos infantiles figuran la atractiva presentación del medicamento y el sabor agradable de jarabes y grageas, lo que unido a la irrefrenable ansia de buscar e ingerir (propia de la psicología infantil) conduce a estos nefastos accidentes, contra los cuales no se han logrado medidas preventivas suficientemente eficaces.

6.- Intoxicaciones por automatismo. Son un tipo especial de sobredosificación debida a que el sujeto, después de haber tomado una dosis, olvida el hecho y toma otra; se genera un cuadro de confusión mental que lleva a que lo olvide de nuevo y repita la dosis y así sucesivamente, hasta que se llega a producir un cuadro tóxico que puede ser muy grave. Este tipo de intoxicación se da de forma especial con los fármacos ansiolíticos e hipnóticos (barbitúricos).

Intoxicaciones suicidas:

El envenenamiento voluntario, ocupa el segundo lugar por orden de frecuencia entre los medios utilizados por los suicidas varones y el primero por las mujeres este tipo de suicidio ocupa en España el quinto lugar para el total de suicidas, varones y mujeres, y el segundo lugar para las mujeres. Estas diferencias pueden deberse a razones muy variadas: época en que se hizo el estudio, circunstancias locales, etc. Atendiendo a su gravedad pueden superar las intoxicaciones accidentales por razón de la dosis absorbida: en efecto. El 90 % de las intoxicaciones graves que requieren tratamiento hospitalario tienen este origen.

En la actualidad ha habido un desplazamiento en los denominados venenos de moda, en virtud de un variado conjunto de circunstancias. En este grupo pueden incluirse las intoxicaciones homicidas, en sujetos adictos a estas sustancias que presentan los rasgos de tolerancia y la dependencia. Según estudio realizado en la dirección, en la unidad de Medicina Legal de la Universidad de Valencia (1996), requirieron ingreso hospitalario el 55% de los casos de autointoxicaciones medicamentosas que fueron atendidas en el servicio de urgencias, siendo el fármaco más utilizado diacepan.³⁵

Intoxicaciones homicidas: No es frecuente que se utilicen los medicamentos con fines directamente criminales, por las dificultades que ofrecen para su administración o dosis letal, sin que la víctima se aperciba de ello, solo el asesino podría agredir a la víctima dormida.^{47, 38, 2, 3} Cualquiera que haya sido el motivo o la causa, por mandato judicial corresponde al laboratorio forense identificar el tipo de sustancia presente en los indicios recolectado en el lugar de los hechos.

Si se produjese la muerte del paciente se lleva a cabo la actuación médico-legal a la que se refiere fig.4. En todo caso aunque la intoxicación no resulte mortal, las implicaciones jurídicas que pueda haber requieren la consideración médico-legal correspondiente por parte de los clínicos del hospital.⁴¹

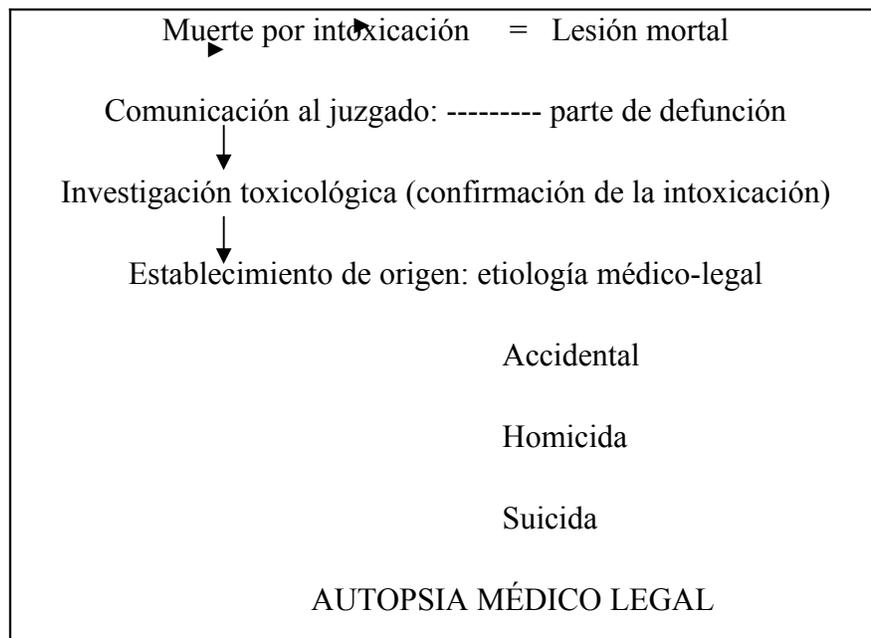


Fig.7⁴¹

a) Inspección de la escena del delito desde el punto de vista toxicológico

Es importante que la autoridad judicial o el investigador que asiste a la escena se cuestioné, la posible presencia de sustancias tóxicas, tanto en la escena como el cadáver. Debe buscar en los alrededores, en las prendas que vestía la víctima en sus manos, en su boca, la presencia de envases vacíos de instrumentos empleados en el consumo de drogas, de pastillas, de sólidos pulverizados líquidos o cualquier otro indicio sospechoso de estar involucrado.

Tras la inspección ocular se redacta una carta donde se incluye población, hora y fecha del inicio del acta, identidad de quienes la llevaron a cabo, identidad de la víctima, descripción del lugar de los hechos acompañada de fotografías de cada elemento examinado. El destino de todos los elementos recogidos será el departamento de toxicología, ya que el equipamiento para la detección de tóxicos es altamente cuantioso, y requiere de personal calificado para su manejo³⁹.

En cuanto al cadáver, este se traslada al Instituto Anatómico Forense para ser sometido a un exhaustivo examen externo o interno, la conocida autopsia. No todas las autopsias siguen el mismo esquema. Depende mucho de lo que el médico forense este buscando.

Así en los casos de posible muerte por envenenamiento se dará más importancia a determinadas zonas como cabellos, uñas, por ser los lugares donde el veneno permanece durante más tiempo, trasladado ahí por el flujo sanguíneo.

También se le dará mayor atención a detalles como el color ó la movilidad de los músculos dentro de su grado de rígor mortis. Lo del color tiene su razón de ser en que algunos tóxicos, son detectados por la tonalidad que dejan en la cara. Está demostrado que el color rosa se debe a la ingesta de barbitúricos, el azafrán al láudano. Una tez excesivamente pálida a la insulina.

La miosis (pupilas contraídas) en casos de opio y barbitúricos, contracciones faciales, y desprendimiento del cuerpo de olores fuertes.

La autopsia médico-legal se diferencia de la clínica en que la primera está dirigida a certificar la muerte, ya que en la Ley de enjuiciamiento criminal debe practicarse.^{40, 41.}

b) Solicitud de Análisis en el cadáver:

Sin importar si se encontraron o no en la escena del delito sustancias sospechosas como tóxicas debe solicitarse al laboratorio la realización de análisis de las siguientes sustancias en el cadáver:

- | | | |
|--------------------|--------------------|----------------|
| a) alcohol etílico | e) anfetaminas | i) plaguicidas |
| b) marihuana | f) barbitúricos | |
| c) cocaína | g) benzodiazepinas | |
| d) opiáceos | h) tricíclicos | |

c) Embalaje: Si se encuentran uno o varios indicios, deberán embalarse por separado, correctamente identificados y deben ser enviados al laboratorio lo más pronto posible.³⁹

La información requerida por el laboratorio es la siguiente:

- a) tipo de delito.
- b) autoridad judicial a quien corresponderá el caso.
- c) nombre completo de la víctima.
- d) numero del caso, o informe policial.
- e) cantidad y descripción de los indicios.
- f) resumen de los hechos para orientar el Análisis

ASPECTOS CRIMINALISTICOS

En sus orígenes, la toxicología forense fue fundamentalmente analítica. El substrato de su estudio se enfocaba únicamente al cadáver. En la actualidad las funciones de esta rama de la toxicología son mucho más extensas, realizando estudios en personas vivas, en cadáveres, y sobre el medio ambiente. Ello explica la gran variedad de muestras con que puede encontrarse el toxicólogo forense, vísceras procedentes de una autopsia, fluidos biológicos de individuos vivos para detectar la presencia de algún toxico, bajo cuyos efectos se ha cometido un delito. El toxicólogo forense debe ser capaz de detectar cualquier sustancia química exógena presente en el material biológico objeto de la pericia; así el gran número de sustancias toxicas constituye una limitación importante, y de hecho la mayoría de los laboratorios dirigen su investigación hacia aquellos tóxicos que, según las estadísticas, están implicados en la mayoría de los casos.²⁷

De manera general los análisis de drogas en fluidos biológicos por parte de los laboratorios forenses tienen esencialmente dos objetivos fundamentales;

- a) Diagnostico en el consumo de una droga de abuso en el marco del proceso judicial.
- b) Diagnostico clínico en toxicología clínica y en tratamientos de rehabilitación.

1.-Tipos de Muestra.

La selección de las muestras adecuadas para el análisis y su correcta conservación son requisitos indispensables en una investigación toxicológica. Estas deben recogerse teniendo en cuenta las condiciones particulares de cada caso: aunque ciertas especies pueden estar siempre disponibles para los estudios toxicológicos; En la siguiente tabla 3 se proporciona información acerca del muestreo en casos de cadáveres.⁴¹

Muestra	Cantidad	Droga a Investigar
Estómago y su contenido	Todo	Cualquier droga ingerida
Hígado	250 gr.	Todas las drogas
Bilis	Toda	Opiáceos
Orina	Toda	Idóneas para drogas de abuso
Cerebro	100 gr. parte media y central	Solventes, Cocaína
Sangre	2 muestras de 5 ml. y 30 ml.	Una para Etanol, otra para drogas
Humor vítreo	2 ml. De cada ojo	Barbitúricos, alcohol

Todas las muestras deben guardarse en congelación antes y después de terminados los análisis las muestras de sangre para determinación de etanol deben conservarse con fluoruro de sodio al 2% Estas son la variedad de especímenes que pueden ser usados para los análisis toxicológicos. La elección final de los especímenes a enviar al laboratorio de toxicología dependerán y deben elegirse en función de las capacidades, recursos del laboratorio, procedimientos de rutina que se usen y de las circunstancias especiales.²⁷

Tanto para el diagnóstico analítico como para el control de la evolución terapéutica de un enfermo intoxicado, las muestras más útiles son sangre orina y contenido gástrico, aunque en casos concretos pueden seleccionarse uñas, cabellos, o heces fecales. Sin embargo es inútil e impráctico solicitar la recolección de todas estas muestras en cada caso para ser analizados toxicológicamente. Las muestras de sangre post-mortem están a menudo hemolisadas y putrefactas, pero son las únicas disponibles. En estos casos puede dejarse la muestra en reposo y utilizarse cualquier porción para el análisis. Para romper o disolver los coágulos, puede aplicarse un tratamiento con ultrasonido (15-20seg.). Muchos casos pueden ser evaluados adecuadamente,

simplemente por pruebas de sangre, debido a que la mayoría de las drogas y las concentraciones de casi todos los tóxicos son más significativos que en otros fluidos. Las trazas de una droga en sangre no pueden ser usualmente confirmadas.²⁷

La orina representa una muestra idónea para realizar una gran variedad de ensayos preliminares en el rastreo de tóxicos. Las ventajas de esta muestra se deben a que la concentración de un tóxico en este fluido puede llegar a 100 veces mayor que en la sangre y además la orina está exenta de proteínas, por lo que las interferencias son mínimas. El uso de otras muestras como el humor vítreo, son causa de recientes estudios toxicológicos en casos de sobredosis, y se ha encontrado que muchas drogas atraviesan la membrana del ojo, por lo que pueden encontrarse en varias concentraciones en este fluido.^{30,11}

El hígado concentra muchas drogas y sustancias tóxicas, ya que es aquí donde son metabolizadas. En casos de sobredosis pueden ser detectadas altas concentraciones de la sustancia en este órgano. El cerebro es frecuentemente utilizado para las pruebas toxicológicas, aunque no son encontradas muchas drogas y las concentraciones son mucho menores que en sangre.^{27,29}

El contenido estomacal es considerado para estimar la cantidad ingerida en dosis tóxicas e identificar cualitativamente sustancias que han sido recientemente ingeridas, es ciertamente buena evidencia para la ingestión de drogas con intenciones suicidas, mientras que una baja concentración puede indicar una sobredosis accidental, especialmente cuando se asocian con una historia de abuso de drogas. Pequeñas cantidades de contenido intestinal puede ser analizada, si el contenido estomacal no está presente, o para la asistencia en la evaluación de la dosis ingerida. El contenido intestinal puede rendir grandes cantidades de la droga después de la sobredosis, cuando poca está presente en el estomago.²⁹

Las muestras de contenido gástrico son esenciales en el rastreo general de tóxicos, ya que no presentan problemas técnicos en su utilización siendo bastante fácil la separación del compuesto tóxico, a menudo se pueden encontrar en ellas cápsulas o tabletas enteras, de fácil identificación. Además si el tóxico penetró por vía oral y no ha transcurrido más de 5-6 hrs. las concentraciones serán normalmente muy elevadas lo que facilita su detección.²⁹

2.-Recolección, embalaje y envío

Idealmente los médicos legistas en sus agencias deben entregar la muestra al laboratorio toxicológico suministrando la información pertinente. Las muestra de otras agencias con fines forenses, deben ser enviados de forma tal que la cadena de custodia pueda ser establecida para fines de juzgado si es necesario.^{31, 32} Los tribunales o juzgados comunicarán al laboratorio el envío que haya efectuado expresando la fecha de expedición, procedimiento utilizado, nombre del transportista y breve descripción del espécimen y su precintado (etiqueta); así mismo se expondrá con la mayor claridad y concesión posible el tipo de investigación que interesa y se acompañara información de todos los datos, clínicos, necrosis, procesales, juzgado de instrucción, numero de averiguación y otros complementarios que puedan tener interés para la investigación^{29, 33}.

Los documentos que se generan en la recepción y análisis de las muestras deben retenerse por un mínimo de 6 meses, al término del periodo una lista de estos debe ser emitida a los revisores y se solicitará el permiso para ser destruidas.^{27, 34}

El éxito de la investigación toxicológica se encuentra estrechamente ligado a la calidad, cantidad y grado de conservación de las muestras que se remitan, por lo que al momento de que el patólogo forense realiza la autopsia tiene un diagnostico presuntivo de la causa de muerte del sujeto, hace la recolección de muestras para hacer analizadas por el toxicólogo y así tener un diagnostico confirmatorio de lo sospechado. Para el examen toxicológico es necesario tener en cuenta los siguientes criterios y la elección del tipo de la muestra se hace mucho más sencilla.

- ° Tipo de veneno sospechoso
- ° Vía de absorción del toxico
- ° Carácter agudo o crónico de la intoxicación.

El patólogo forense o la persona que haga la recolección de la muestra debe cumplir como mínimo con las recomendaciones de asepsia y seguridad, es decir se deben manejar las muestras con bata, cofias, guantes, cubre bocas, frascos limpios o estériles, instrumental quirúrgico aséptico o estéril para evitar tanto un contagio personal como una contaminación de la muestra y por tanto alteración de la evidencia³⁴

Las muestras deben ser introducidas en recipientes de vidrio ámbar perfectamente limpios y secos, de tamaño adecuado (considerando que la cantidad de muestra varía desde los 30 g hasta todo el contenido gástrico disponible), las tapaderas deben cerrar siempre herméticamente y los recipientes deben ser de un solo uso, no deben usarse tapones de goma o material similar so pena de contaminar las muestras o que sean absorbidos los tóxicos presentes ^{27,33}

Los frascos deben ir correctamente etiquetados con los datos de la agencia investigadora que genera la solicitud de análisis, cuando la muestra esta contenida en varios paquetes, todos y cada uno de ellos deberá estar etiquetado con el nombre de la victima si se trata de vísceras o líquidos orgánicos, juzgado de instrucción y fecha.²⁷.

Se debe insistir que las muestras destinadas al análisis toxicológico no deben contener conservadores que puedan interferir en el análisis posterior: pero un toxico en una muestra biológica puede descomponerse durante el almacenamiento por lo que ya no será detectado durante el análisis, este hecho se hace importante cuando se desconoce la identidad del toxico; para la porción del contenido estomacal al menos 100 gramos, deben ser preservados independientemente con un preservativo no volátil como el fluoruro de sodio, todas las muestras deben ser refrigeradas hasta el momento de su análisis, una vez descongelado el tejido debe de analizarse de inmediato y subsecuentemente destruirlo.²⁷.

De esta forma, por ejemplo la elección de una muestra de contenido estomacal debe considerarse cuando el veneno o toxico fue ingerido por vía oral en grandes cantidades.

Las ventajas que presenta el trabajar con este tipo de muestras es que se pueden encontrar drogas sin cambio, la identificación es relativamente simple. Las desventajas que presenta son que el análisis solo es cualitativo y pueden emulsificarse las muestras cuando son sometidas a extracciones.³³.

Cuando la muestra es producto de un paciente vivo, o se recupera de la escena de la muerte, es de utilidad enviar el vomito al laboratorio, en la necropsia el contenido gástrico se recupera en un recipiente de vidrio provisto con una tapa que embone perfectamente, de la misma forma que el vomito, al abrir la curvatura menor con tijeras y permitiendo que el contenido salga por

gravidad. Algunos laboratorios solicitan la pared del estomago, ya que los restos de polvo o tabletas permanecen adheridos en altas concentraciones en los pliegues de las mucosas.³⁵

El tiempo que el patólogo o el perito responsable toma para embalar, identificar y enviar o remitir la muestra también es un factor importante en la emisión de los resultados, ya que durante el proceso el toxico o la muestra en sí, puede sufrir deterioros causados por las condiciones climáticas y las inherentes a la degradación natural de las muestras biológicas, por lo cual se debe establecer no solo las condiciones de temperatura (uso de sustancias refrigerantes) y exposición al ambiente, sino también el tiempo máximo permitido para la remisión-recepción-análisis de la muestra.^{27,33}.

Temperatura:

Las bajas temperaturas favorecen la conservación de las muestras para el análisis toxicológico. En términos generales se recomienda almacenar las muestras a $T=4^{\circ}\text{C}$. siempre que vayan a ser analizadas en unos pocos días; si van almacenarse por más tiempo deberán congelarse a $T=-20^{\circ}\text{C}$ pero teniendo la precaución de descongelarlas por única vez antes de ser analizadas. Durante la congelación-descongelación puede producirse la reducción de ciertos metabolitos (sulfóxidos, N óxidos formados durante el metabolismo de las fenotiacinas): con lo que habrá diferencias importantes entre la concentración inicial del tóxico y la hallada en el análisis efectuado tras congelar-descongelar.

Contaminación: La contaminación de la muestra consiste fundamentalmente en el paso a ésta de compuestos formados durante la putrefacción de los tejidos, así como de componentes de los envases donde se disponen las muestras.

° Un caso típico que resulta de esta es la fenilalanina, base putrefactiva que comienza aparecer en tejidos, sangre, orina, antes de los 5 días tras la muerte cuando las muestras no se han almacenado y conservado adecuadamente.

° Contaminante Procedente de los envases fundamentalmente son plastificantes tipo ftalatos procedentes de los envases de plástico o de los tapones de los recipientes que contienen las muestras. También pueden tener su origen en las impurezas de los solventes utilizados para la

extracción. Asimismo son frecuentes los ésteres fosfóricos procedentes de los tapones de los envases. Por ello es conveniente conocer las posibles interferencias del material utilizado en los envases y comprobarlo en cada lote.²⁷.

Estabilidad Química de barbitúricos en Fluidos: Uno de los factores que debe ser considerado en la interpretación de resultados toxicológicos, es la validez de los mismos para la prueba y para ello debemos tomar en cuenta factores como la eficiencia del método de extracción para la identificación y cuantificación del tóxico y el deterioro que puede sufrir este durante su almacenamiento.

Oxidación

Para aquellos compuestos fácilmente oxidables [catecolamínas, tiobarbituricos]. Los envases deben estar llenos y perfectamente cerrados para excluir el oxígeno atmosférico. Se pueden adicionar antioxidantes, como ácido ascórbico o metabisulfito sódico (1%, p/v), para eliminar el oxígeno de la solución, pero estos agentes pueden reducir los metabolitos oxidados de algunos tóxicos presentes en la orina, transformándolos de nuevo en sus productos originales (fenotiacidas, antidepresivos tricíclicos, algunos antihistamínicos). Los compuestos fenólicos (paracetamol, morfina) se oxidan fácilmente a 4°C y los que contienen azufre son también oxidados in vitro en medio alcalino. Así, el tiopental puede convertirse en pentobarbital durante la reextracción de un solvente orgánico en una solución acuosa básica y, además, oxidarse rápidamente a temperatura ambiente, tanto en soluciones acuosas como orgánicas.

Un factor importante en los procesos oxidativos es la presencia de iones metálicos que actúan como catalizadores. El efecto de los iones puede disminuirse adicionando una proteína como la seroalbúmina bovina. Por esto, algunos compuestos lábiles son más estables en plasma que en soluciones acuosas.⁴⁷

VI.-COMPARACIÓN DE MÉTODOS

El laboratorio forense emplea una variedad de procedimientos analíticos. Primero realiza pruebas,

Preliminares o screening. (De rastreo u orientación), que determinan la presencia o ausencia de grupos de sustancias tóxicas en las muestras, los resultados son sometidos a un procedimiento analítico que identifica a un tóxico específico. La segunda prueba confirmatoria, debe basarse en principios químicos o físicos, diferentes de la primera. En la actualidad se considera que las determinaciones cromatográficas (capa fina o gaseosa) y la espectrometrías de masas (EM), proporcionan una identificación inequívoca para la mayoría de los tóxicos aunque tienen sus limitaciones. De acuerdo con el procedimiento de buenas prácticas de laboratorio se deben establecer procedimientos normalizados de trabajo que garanticen un trabajo sistemático y unos resultados seguros, estos resultados de laboratorio forense y de autopsia realizada por el médico legista, una vez realizados los exámenes toxicológicos, el patólogo forense debe interpretar los resultados y contestar al juez preguntas específicas como las siguientes: ³⁵.

- Rutas de administración del tóxico: en su determinación deben considerarse los resultados de varias muestras, como regla general la concentración más elevada del tóxico se encontrará en el sitio de administración, así una concentración más elevada en el tracto digestivo y en el hígado corresponde a un tóxico ingerido.
- Una concentración más elevada en el pulmón indica un tóxico inhalado, y el hallazgo de un fármaco en el tejido circulante a un punto de inyección indica inyección reciente I.M. o I.V.
- La presencia de un tóxico en tracto gastrointestinal no es prueba suficiente para atribuirle la muerte. Para ello es necesario demostrar, que se llevó a cabo la absorción del tóxico, y que fue transportado por la circulación a los órganos donde ejerció su efecto letal, esto se establece mediante los análisis de muestra de sangre y de otros órganos. Dosis administradas: En cuanto a su determinación se debe tener en cuenta la duración de la sobrevida y los tratamientos médicos administrados, el intervalo entre la administración de un tóxico, y si pudo ser suficientemente prolongado para permitir la excreción y biotransformación del agente.

A) Elección del Método Analítico

La técnica escogida debe ser sensible y específica, la rapidez y el costo se pesan en función del equipo del laboratorio, de la disponibilidad y competencia del personal;

-Las técnicas cromatografías son más largas ya que necesitan un tratamiento de las muestras antes de la inyección; el tratamiento de la muestra previa a toda inyección cromatográfica es una etapa importante que permite eliminar las proteínas de la muestra que dañarían la columna, concentrar si es necesario la sustancia a analizar.⁴⁷

- Las técnicas inmunológicas son más rápidas porque se utilizan en una dilución de la muestra, pero con frecuencia son caras.³⁹ Todos los compuestos extraños o xenobióticos 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 podemos resumir de la manera siguiente;

1.- a) Análisis Indirecto: 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, realizando posteriormente 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.

b) Muestras No Biológicas: Como las muestras pueden ser tan disímiles, existen varios procedimientos de "Screening" dependiendo del estado físico de la sustancia, solubilidad, y de la naturaleza químico-física de la muestra en cuestión. Independiente de la modalidad de los análisis, generalmente existen 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.

2.-Análisis Directo:

a) Fluidos Biológicos: Esta modalidad implica la aplicación de procedimientos de extracción y determinación específicas para una determinada 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.

b) 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 sospechosa, debido a que los antecedentes del caso así lo requieren.

Analítica de los tóxicos orgánicos no volátiles o Tóxicos Orgánicos Fijos (TOF) o no volátiles se incluye una gran variedad de sustancias orgánicas, de interés toxicológico, que no pueden aislarse por destilación de las matrices que los contienen, sino que debe recurrirse a la acción de disolventes orgánicos (en medio ácido o alcalino) para su separación y posterior identificación. La mayoría de estos tóxicos sufren profundos cambios metabólicos en el organismo y, en consecuencia, pueden aparecer en los fluidos o tejidos en su forma original o como productos de biotransformación (metabolitos), libres o conjugados con diferentes compuestos (ácido glucurónico, sulfatos, aminoácidos, etc.). Las propiedades físico-químicas del tóxico y sus metabolitos pueden ser muy distintas, a veces incluso entre los metabolitos de un mismo compuesto. Ello determina una excreción característica según los casos y la conveniencia de realizar la investigación en una u otra matriz (orina, sangre, bilis, etc.). Frecuentemente la especie que será analizada está presente en un tejido o un fluido biológico, unido a proteínas u otros constituyentes celulares. En este caso, puede ser necesario separar el tóxico (el compuesto madre o sus metabolitos) del resto de los componentes de la matriz, de modo de obtenerlo en cantidad y pureza suficientes para permitir su identificación y cuantificación. Sólo recientemente han surgido métodos disponibles que permiten la medida directa de algunos analitos sin la separación previa de su matriz. El analista toxicólogo ha experimentado un crecimiento paulatino en el número de técnicas a su disposición. En la actualidad la clásica metodología convencional ha sido reemplazada por la introducción de métodos instrumentales más sofisticados, de gran sensibilidad y precisión pero cuyo costo elevado limita su disponibilidad en la mayoría de los

Laboratorios de nuestro medio. Los TOF tienen en común el uso de metodologías similares para su aislamiento, caracterización y cuantificación.

Técnicas Cromatograficas La búsqueda de TOF mediante técnicas cromatográficas, como **Cromatografía en capa fina, CLAE, GC** (Gas Cromatografía Gaseosa), etc. se caracteriza porque antes de aplicarlas es necesario separar las drogas de la matriz en la que se encuentran inmersas mediante alguna técnica de extracción. En la práctica esto se logra siguiendo una serie de pasos, como los que se describen a continuación.

Preparación de la Muestra:

Es un paso crucial en los análisis, involucra la homogeneización de la muestra, ajustes de pH, pesaje, procedimientos de hidrólisis (ácida, básica o enzimática), precipitación, centrifugación, etc. de modo que se facilite el aislamiento de la sustancia de interés.²⁷

Aislamiento del analito:

el método de aislamiento dependerá de la naturaleza del tóxico que se quiera buscar en el caso de las drogas la tendencia ha sido desde la extracción con cloruro de n-butilo, que fue uno de los primeros solventes declarados como extractores selectivos de drogas, después las extracciones con sales y con solventes, o sea los métodos de "Salting - out", hasta la cada vez mas empleada extracción en fase sólida la cual presenta muchas ventajas con respecto a todas las anteriores, como son mayor selectividad, ahorro de solventes y de tiempo, extractos más limpios y mayor recobrado de los analitos , etc. Existen muchos trabajos que comparan la extracción líquido-líquido con la extracción en fase sólida, demostrándose cada vez más sus ventajas, pero no obstante a ello la extracción líquido-líquido se sigue utilizando, dependiendo de los recursos con que cuenta cada laboratorio.

Concentración del extracto: El objetivo de este paso es colocar el analito en el menor volumen posible para de esta manera aumentar la sensibilidad de los análisis. Se deben usar condiciones controladas, idealmente una temperatura menor de 40°C y corriente de nitrógeno. Durante las operaciones antes mencionadas se debe tener sumo cuidado para evitar pérdidas por volatilización, oxidación o absorción en los precipitados, ya que frecuentemente los productos a identificar están presentes en cantidades menores del g/ ml. Las pérdidas por volatilización de sustancias básicas como anfetaminas pueden prevenirse cuidando la temperatura y salificando el extracto con ácido clorhídrico al 1 % en metanol.²⁷

Identificación del Analito: existen diferentes niveles de complejidad dependiendo de las técnicas que se utilicen para la detección de las mismas. Así tenemos un nivel primario que utiliza técnicas de identificación como la Cromatografía en Capa delgada y la Espectrofotometría UV, además de reacciones de coloración para la orientación, etc. Un nivel secundario involucra técnicas tales como la cromatografía de gases y la Líquida de alta resolución ya sea para Screening como para la determinación directa y un nivel terciario que utiliza la Espectrometría de masas acoplada con una cromatografía separativa tal como la cromatografía de gases y la líquida de alta resolución. Antes de la aplicación de la Cromatografía de gases y de la CG/EM la derivatización de los grupos funcionales es esencial para la detección de drogas a bajos niveles. La derivatización mejora la especificidad, la sensibilidad y la precisión de los análisis, además las llamadas colas en los cromatogramas se eliminan considerablemente con la aplicación de procedimientos de derivatización y mejora considerablemente la separación de sustancias conteniendo grupos funcionales tales como -COOH, -NH, -NH₂ o -OH. Los procedimientos de derivatización más utilizados son la Silanización con N, O-bis-trimetilsililfluoroacetamida (BSTFA), la Acilación con anhídrido pentafluoropropiónico (PFPA), Alquilación/Acilación, etc.

Cuantificación del Analito: Una vez identificado el analito la cuantificación del mismo se puede realizar por una técnica directa, bien definida y utilizando patrones de referencia puros para análisis. Esta técnica directa generalmente es una técnica cromatográfica gas- líquida o líquida-líquida y la Espectrometría acoplada a estas dos anteriores ⁴¹

Técnicas analíticas disponibles:

En la actualidad existe una gran variedad de técnicas a disposición del toxicólogo que abarcan desde los clásicos métodos no instrumentales (reacciones colorimétricas, tests micro-cristalinos etc.), hasta los métodos instrumentales más sofisticados. En efecto, el análisis químico ha experimentado en los últimos años un considerable desarrollo, caracterizado esencialmente por el empleo de instrumentos, más o menos complejos, capaces de medir propiedades físicas o químicas que permiten la identificación y la cuantificación de los compuestos químicos. Las técnicas instrumentales conocidas son: Reacciones de color, Técnicas inmunoquímicas, Técnicas espectrofotométricas, Técnicas cromatográficas.

Inmunoensayos Existen en el comercio numerosos tipos de inmunoensayos con aplicaciones en Toxicología. En su mayoría están diseñados para el análisis de muestras líquidas, como orina, agua y suero debido a que estas matrices presentan poca cantidad de interferencias. Estas muestras se emplean en forma directa, evitando por lo tanto el paso previo de extracción o aislamiento de los analitos y logrando una reducción importantísima en el tiempo de obtención de los resultados (10 minutos – 1 hora). La técnica tradicional consiste en mezclar un volumen de muestra conteniendo la droga a ensayar, con una cantidad fija de un anticuerpo específico.²⁷

a) Pruebas preliminares.

Dada la complejidad que adquiere un análisis toxicológico, cuando no se tienen parámetros de referencia de la posible causa o forma de intoxicación y si estos no pueden ser proporcionados por alguna fuente, es necesario contar con procedimientos que nos permitan establecer la identidad o tipo de droga que puede estar presente en una muestra de contenido estomacal o cualquier otro fluido biológico, estos procedimientos se refieren a las pruebas preliminares o screening (rastreo), las más sencillas que pueden realizarse desde el momento en que se toma la muestra, ó en su momento de ingresar al laboratorio.⁴⁸

De esta forma la tarea del analista se ve facilitada, pues dirigirá su análisis hacia un tóxico o grupo de tóxicos en específico disminuyendo tiempos, gasto de reactivos y materiales, obviamente cuando se cuenta con información, cualquiera que sea la fuente, de cómo sucedió la intoxicación, la sistemática se vuelve aún más sencilla porque solo sería necesario confirmar la presencia del tóxico.⁴⁷.Dentro de las pruebas rápidas, también llamadas presuntivas, que se pueden realizar al momento de recolectar la muestra porque no requieren del uso de equipo o materiales sofisticados se encuentran las de desarrollo de color;

1.- Reacción con desarrollo de color

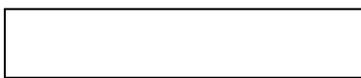
- **Reacción de Parry-Koppanyi:** Se toma 1 ml de la solución del residuo metanólico, se coloca en una placa o en un vidrio de reloj y se le agrega 3-4 gotas de solución

alcohólica de nitrato de cobalto al 1%. Mezclar con varilla e incorporar 1-2 gotas de solución alcohólica de isopropilamina al 5%. Aparición de color violeta o azul-violeta nos indica la presencia de compuestos que presentan la siguiente agrupación: -CO-NCO, entre ellos los principales ejemplos son: barbitúricos, hidantoínas, xantinas, creatinina, narcóticos derivados de la piperidina. la sensibilidad es de 1 mg.

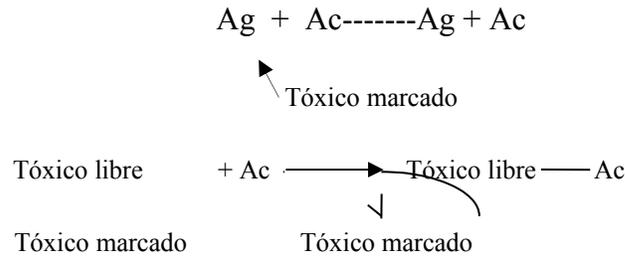
- **Reacción de Zwicker:** A 0,5 ml de la solución metanólica, se le agregan 0,5 ml de CuSO_4 al 5%. Mezclar suavemente e incorporar 0,5 ml de solución clorofórmica de piridina al 5%. Se agita enérgicamente y se deja separar la capa clorofórmica (inferior). La aparición de color púrpura nos indica la presencia de un derivado barbitúrico, los tiobarbitúricos dan coloración verde, las hidantoínas, color azul, los derivados de las xantinas, color verde. Este ensayo es más sensible que la reacción anterior permitiendo detectar del orden de 100 μl . Además no requiere solubilización previa y tiene menos interferencia.
- **Pruebas a la gota:** En general se dividen en reacciones a la gota con formación de precipitado de color inmunoensayo. Se realizan sobre muestras decomisadas y en extractos obtenidos de la muestra biológica.

2.-Técnicas de inmunoquímicas.

Todas ellas se basan en los procedimientos inmunoquímicos clásicos y utilizan como principio analítico la reacción antígeno-anticuerpo. Utilizan un complejo antígeno-anticuerpo, donde el antígeno es el tóxico convenientemente marcado. El ensayo consiste en el desplazamiento



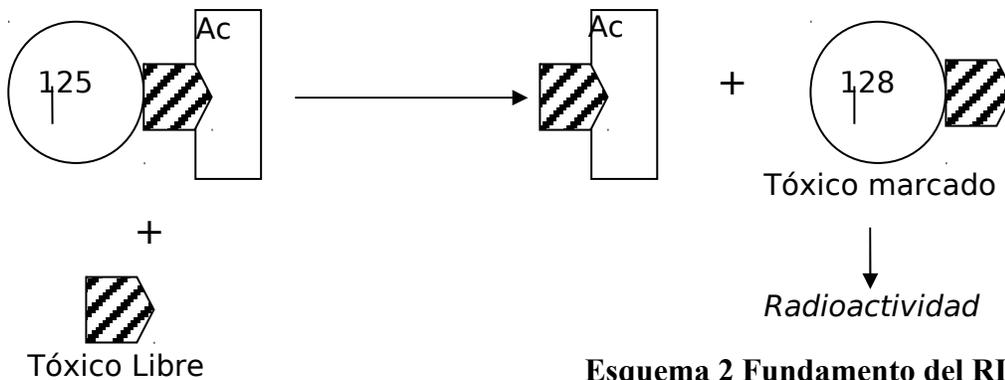
competitivo del tóxico marcado del complejo antígeno anticuerpo por el tóxico libre presente en la muestra analizada. El tóxico marcado, liberado al medio se utiliza para determinar la presencia y/o concentración del tóxico presente en la muestra problema. (fig.1) se aplican en especial para drogas de abuso y psicofármacos, incluyendo a los barbitúricos.



Esquema 1 Fundamento de las técnicas inmunoquímicas ⁴⁷

a) Radioinmunoanálisis (RIA)

Esta técnica utiliza un tóxico marcado con un isótopo radiactivo, como I¹²⁵, C¹⁴ o H³ En el ensayo se equilibra una mezcla que contiene anticuerpo (Ac), tóxico marcado (Ag), y tóxico no marcado. El complejo Ac-tóxico es separado por precipitación. El tóxico marcado liberado permanece en el sobrenadante, donde se determina su concentración por medición de la radiactividad (fig. 2). La principal ventaja del RIA es su gran sensibilidad. De más de poder aplicarse a muestras muy variadas. ⁴⁷



Esquema 2 Fundamento del RIA ⁴

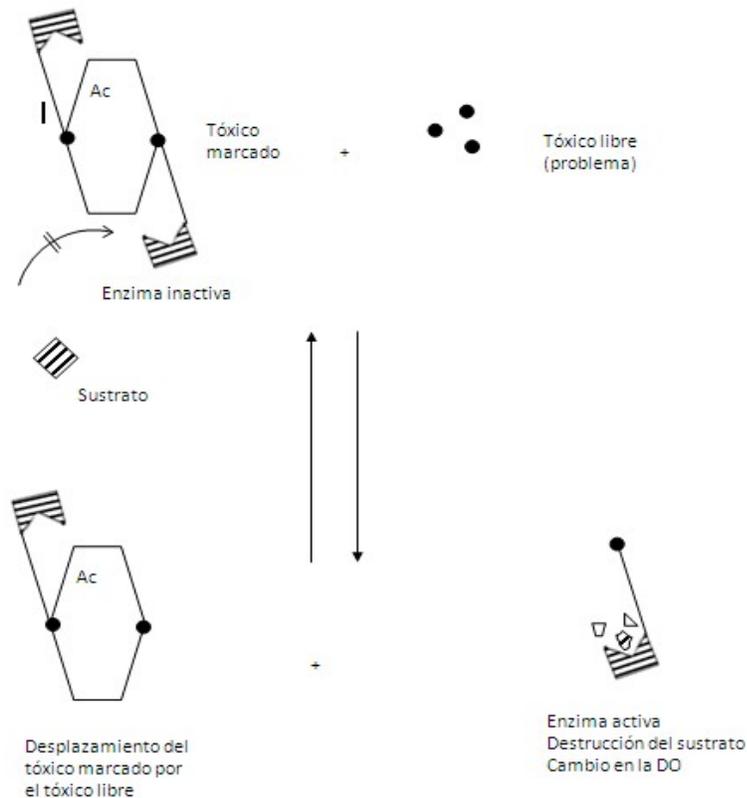
b) Enzimoimmunoanálisis [EMIT]

Esta técnica utiliza tóxicos marcados con lisozima capaz de lisar las paredes celulares bacterianas. La actividad de las lisozimas no se afecta por la unión con el tóxico, pero su centro activo no es asequible al sustrato. El tóxico libre presente en la muestra problema desplaza el

tóxico marcado, con lo cual se produce un incremento de la actividad enzimática que se manifiesta por cambios en la densidad óptica de las soluciones.

Cuando en la muestra problema no hay tóxico, la densidad óptica de la mezcla de reacción no cambia esencialmente, indicando poca o ninguna actividad enzimática. Además de la lisozima se utiliza como marcador la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6P-DH), la posible interferencia sérica se previene utilizando NAD° , que funciona solo con La G6P-DH bacteriana usada en el ensayo. Esta técnica puede aplicarse directamente sobre orina o plasma, o incluso también sobre extractos de materiales biológicos como sangre, tejidos, etc. aumentando así sus aplicaciones. Otros materiales, como píldoras, tabletas, etc. pueden analizarse

También con EMIT disolviéndolos previamente con el tampón utilizado en el ensayo.⁴⁷



Esquema 3 del fundamento EMIT ⁴⁷

c) Inhibición de la hemaglutinación [IH]

El marcador utilizado en este sistema está constituido por glóbulos rojos estabilizados mediante tratamiento con formaldehído. En ausencia del tóxico los eritrocitos que han sido sensibilizados con dicho compuesto reaccionan con los anticuerpos específicos (antitóxicos) y se produce una

aglutinación uniforme con el fondo del matraz en la que se lleva a cabo la reacción. Si la muestra problema contiene el tóxico, este se une al anticuerpo impidiendo la unión con los glóbulos rojos sensibilizados, que de esta manera sedimentan y forman un anillo característico en el fondo del matraz de decantación. La aplicación de estas técnicas es tanto cualitativa como cuantitativa, mediante la utilización de patrones de concentración conocida. El único defecto de los inmunoanálisis, es la falta de especificidad con posibilidad de reacciones cruzadas, por lo que requieren siempre de confirmación por otras técnicas alternativas. Esto es especialmente importante en muestras de interés judicial.

Otro inconveniente es el elevado costo de los reactivos utilizados. Por el contrario su gran rapidez y sensibilidad hacen de estas técnicas el método de elección para el screening de gran número de muestras en situaciones concretas.

d) Inmunoanálisis por interacción cinética de partículas (KIMS) competencia

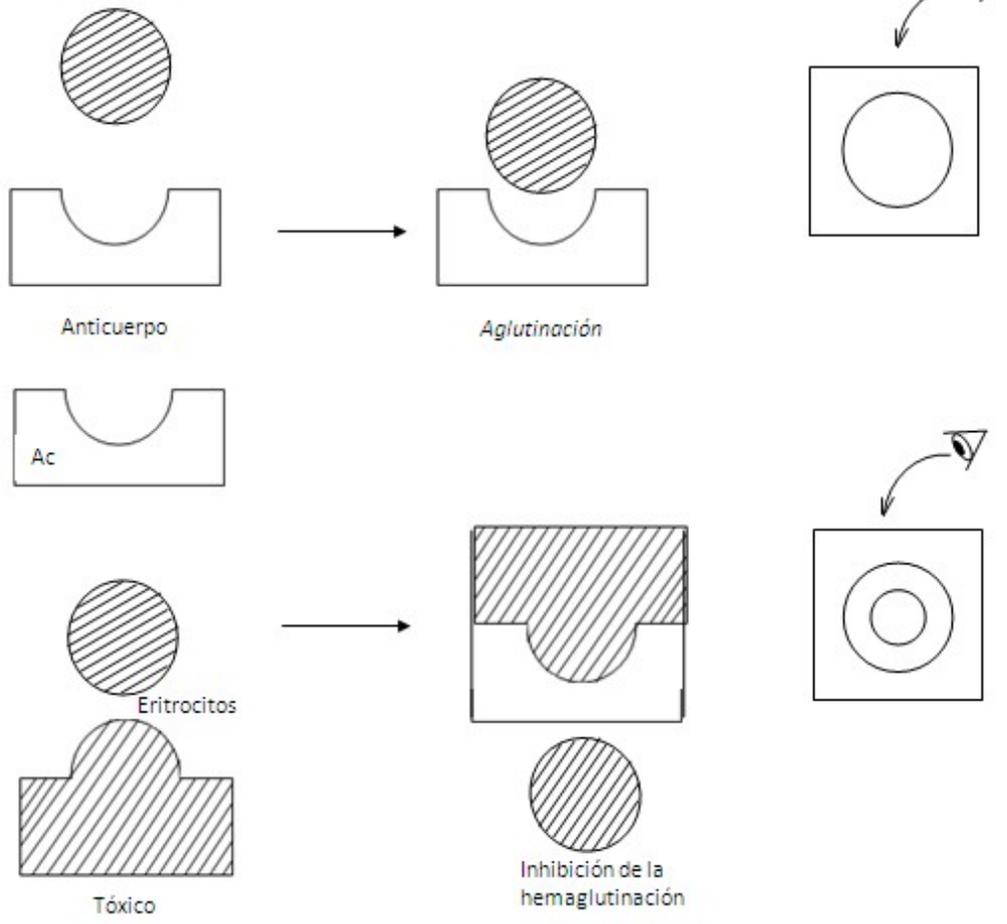
Por unirse al anticuerpo y evitar formar agregados de macropartículas

Permiten identificar sin dificultad los componentes de los principales grupos terapéuticos de interés (barbitúricos, antidepresivos, tricíclicos.etc.).El screening se puede complementar con el empleo de técnicas inmunoquímicas (EMIT).para aquellos grupos de tóxicos orgánicos que requieren una especial sensibilidad o presenten características muy particulares. Aunque el screening de tóxicos orgánicos puede abordarse también por técnicas como cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta resolución.la cromatografía en capa fina representa una alternativa válida y asequible a cualquier laboratorio.⁴⁷

Las técnicas antes descritas únicamente proporcionan un resultado analítico preliminar cualitativo. Para obtener la confirmación de un resultado, debe emplearse un método químico alternativo más específico sensible y cuantitativo.

El diagrama siguiente representa el fundamento de la hemaglutinación [IH]

Eritrocitos sensibilizados



Esquema 4 del fundamento de hemaglutinación⁴⁷

3.- técnicas espectrofotométricas:

Se basan en la capacidad que tienen las moléculas y los átomos de absorber radiaciones de diferente longitud de onda (λ) característica para cada sustancia, utilizando la energía de dichas radiaciones ($h\nu$) para producir cambios energéticos en su estructura. En los átomos estos cambios se refieren exclusivamente a transiciones electrónicas. En las moléculas los cambios energéticos son debidos a movimientos electrónicos, así como a movimientos de vibración y rotación de las moléculas.

a) Espectrofotometría ultravioleta visible

Cuando la luz pasa a través de una solución que contiene una sustancia capaz de absorberla, una parte es absorbida, otra, reflejada y el resto, transmitida. La cantidad de luz absorbida (absorbancia o densidad óptica de la solución) es proporcional a la concentración de la solución y a la longitud del camino recorrido a través de aquella. Esta técnica es, pues, sólo orientativa, aunque el estudio de la absorción inespecífica en la región de 200-400nm, junto con la observación de las variaciones que originan en dicha absorción los cambios de pH, puede servir para la identificación aproximada de un problema. haciendo uso de tablas.

Determinación de Barbitúricos en sangre por espectrometría U.V.

A 2 ml de sangre se le adicionan 50 ml de agua destilada, se homogeneiza y se le adicionan 15 ml de Tungstato de sodio al 10 % en agua y 15 ml de H₂SO₄ al 2 %. Se coloca 3 minutos a 100 °C. Se filtra y el filtrado se somete a dos extracciones con éter etílico. Se reúnen los extractos y se extrae con 10 ml de NaOH 0.45 M. Se registra el espectro uv contra patrón de NaOH 0.45 M. Posteriormente a 3 ml de este extracto se le añaden 0.5 ml de NH₄Cl al 16 %. Se hace lo mismo con el blanco (para llevar de pH - 13 a pH -10) y se registra el espectro nuevamente. En presencia de un barbitúrico se observa un corrimiento betacrómico. Generalmente se recomienda seguir una estrategia que consiste en aplicar, una técnica de Screening inicial para descargar las muestras negativas y confirmar por otra técnica, las muestras positivas.⁴¹

b) Espectrofotometría infra-roja

Es uno de los métodos más usados para la identificación de compuestos desconocidos. Un espectro infra-rojo puede obtenerse en menos de 2 min y la muestra no es alterada ni destruida. Cada compuesto produce un espectro diferente, de forma que un espectro infra-rojo es equivalente a una « huella dactilar » de la sustancia examinada. Todos los compuestos orgánicos y algunos inorgánicos absorben luz en la región infra-roja y del espectro electromagnético.

Cada grupo funcional químico tendrá unas frecuencias características que servirán para identificarlos en una sustancia desconocida. Esas frecuencias características se denominan «frecuencias de grupo » y son ejemplo típico: OH, NH, CuO, CuN, CuC, NO₂, etc. Por ello un espectro infra-rojo puede dar con rapidez información sobre la presencia o ausencia de ciertos grupos funcionales, o características estructurales, presentes en un compuesto desconocido. La aplicación fundamental de la espectrofotometría infra-roja es el análisis cualitativo, debiéndose utilizarse espectros de referencia y datos tabulados para su interpretación. Aunque el espectro infra-rojo puede ser el mejor método para identificación de una sustancia presenta un doble problema:

- Por un lado requiere de una gran pureza de la muestra.
- Necesita una cantidad de muestra algo elevada

No por falta de sensibilidad de la técnica, sino por la dificultad en la manipulación de la muestra. Por todo ello, en la actualidad el uso de esta técnica en Toxicología encuentra su mayor aplicación en combinación con la cromatografía de gases.

4.- Técnicas cromatográficas

La cromatografía puede definirse como la técnica de separación de una mezcla de solutos, basada en la diferente velocidad con que se mueve cada uno de los componentes a través de un medio poroso, arrastrados por un disolvente en movimiento.⁴⁷

La cromatografía se distingue:

1. Fase estacionaria: puede ser líquida o sólida.
2. Fase móvil: puede ser un líquido (un disolvente o una mezcla de disolvente) o un gas.

Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse sobre la base de diferentes criterios:

1. Atendiendo a la naturaleza de la fase móvil y la fase estacionaria:

a) Cromatografía líquida:

- Cromatografía líquido-líquido.
- Cromatografía líquido-sólido.

b) Cromatografía gaseosa:

- Cromatografía gas-líquido.
- Cromatografía gas-sólido.

2. Atendiendo el tipo de soporte sobre el que se dispone la fase estacionaria:

a) Cromatografía en columna:

- Gases.
- Cromatografía Líquida Alta Resolución.
- Cromatografía en papel.
- Cromatografía en capa fina.

Cromatografía de capa fina

Los valores de Rf en combinación con un revelado secuencial permiten detectar e identificar sin dificultad los componentes de los principales grupos terapéuticos de los barbitúricos. Ha sido la técnica clásica de elección por sus características de sencillez bajo costo. Mediante la utilización de una serie adecuada de patrones y medios de desarrollo, la cromatografía en capa fina pretende detectar en un tiempo corto gran número de sustancias. Los valores de Rf en combinación con un revelado secuencial permiten detectar e identificar sin dificultad los componentes de los principales grupos terapéuticos de interés (barbitúricos, antidepresivos, tricíclicos.etc.). Los inconvenientes que se le atribuyen a esta técnica en cuanto a necesidad de múltiples extracciones, interpretación subjetiva de los resultados, falta de sensibilidad, están actualmente superados existiendo en el mercado kits que facilitan en gran medida el manejo de las muestras de las que se requiere un volumen mínimo. Se consigue así reducir de modo considerable el tiempo de análisis para la mayoría de los tóxicos la sensibilidad es de 1 mg/l.

Tabla. 4 Screening por Cromatografía en Capa Fina.⁴¹

Sistema	Soluciones Standard	Fase Móvil	Reveladores
A	Pentobarbital Fenobarbital Fenitoina	Cloroformo: Acetona 45:5	HgSO ₄ (5g de HgO + 20 ml de H ₂ SO ₄)

Los reactivos se atomizan en el orden en que aparecen, pero, al menos antes del paso 4 la placa debe secarse con aire caliente después de cada atomización. En la interpretación de los cromatogramas debemos tener en cuenta no solo el Rf relativo de la muestra que se está investigando sino también la forma y el color de la mancha así como el comportamiento post revelación. El límite de detección para la cromatografía en capa delgada tiene un límite de detección de entre 1 y 5 ug.

Todas las placas deben exponerse al UV antes de atomizarse con los respectivos reveladores y anotar cualquier hallazgo importante. El sistema A es selectivo para barbitúricos, los que dan

manchas blancas las cuales pueden ser fugaces en la mayoría de los casos, por tanto se recomienda anotar los resultados inmediatamente después de atomizada la placa.⁴¹

a) Técnicas Confirmatorias:

Que comprueban el resultado anterior o lo obtienen directamente, por tener mayor capacidad de detección y seguridad. las buenas prácticas de laboratorio (BPL). Recomiendan efectuar la identificación por dos técnicas diferentes basadas en fundamentos fisicoquímicos distintos: estas técnicas son cromatografía de gases (gas-liquido), cromatografía de líquidos (líquidos-líquidos) de alta precisión o resolución, espectrometría infrarroja y la de mayor discriminación y seguridad el sistema cromatografía gaseosa, o de líquidos y la espectrometría de masas³⁵.

Para mejorar las características cromatograficas de sustancias polares, aumentando su polaridad, volatilidad o su estabilidad térmica, se preparan derivados de los tóxicos extraídos, lo cual proporciona más iones típicos que favorecen la identificación por espectrometría de masas. La derivatización consiste en acetilación (mediante reacciones con anhídrido acético) de las aminas primarias y secundarias y de hidróxidos alcohólicos y fenólicos, frecuentes en los metabolitos: o etilación de ácidos carboxílicos por tratamiento con diazometano ó diazoetano.³⁵

Cuando sabemos el grupo farmacológico o químico al cual pertenece la sustancia a identificar en la muestra, se procede a la confirmación de su identidad utilizando métodos más específicos, precisos y altamente sensibles. La mayoría de ellos son complejos para ejecutar y requieren de equipo especial y experiencia en el manejo de los mismos. Se clasifican de acuerdo al fundamento del método como. Cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta eficiencia.

Métodos cuantitativos (técnicas de confirmación)

Las técnicas cromatograficas solas, no son capaces de suministrar una identificación inequívoca de un compuesto particular y la confirmación por técnicas específicas como la cromatografía de gases es a menudo obligatoria. Además debemos enfatizar que no existe un método de análisis único en los estudios forenses, ya que un análisis toxicológico debe ser lo más específico posible para los fines legales en cuestión.

1.-Cromatografía de gases [GLC]

En este sistema la fase móvil es un gas inerte (hidrogeno, argón, nitrógeno) que fluye a través de una columna que contiene la fase estacionaria: ésta puede ser un adsorbente (cromatografía gas-sólido) o un soporte inerte recubierto por un líquido relativamente poco volátil (cromatografía gas-líquido). El tubo de la columna tiene entre 3 y 6 mm de diámetro y puede ser de cobre, aluminio, acero inoxidable, vidrio, o cuarzo. Está lleno de un soporte finamente tamizado que puede haber sido lavado con un ácido o una base y tratado con silano como el hexametildisilazano para reducir los sitios de absorción. La silanización reemplaza los hidrógenos del soporte por el radical trimetil-silil. El soporte, tratado o no, está recubierto con una fase adecuada.⁴⁷

Para gases y solutos no polares de alta volatilidad puede usarse cromatografía gas-sólido. Así no se requiere ningún líquido sobre la gran área superficial del adsorbente de relleno. Técnicas recientes han eliminado la necesidad de empaquetar con un soporte sólido, al utilizar un tubo capilar cuyas paredes están recubiertas con la fase estacionaria líquida. La columna es solamente una parte del sistema cromatográfico. La unidad debe disponer, además de un horno perfectamente regulado que albergue la columna: un inyector a través del cual se pueda introducir la muestra en la columna: un detector (también con temperatura regulable): un medio de programa: y regular el flujo de la fase móvil y cualquier otro gas que pueda necesitar el detector, y un medio adecuado para amplificar y registrar aquello que el detector <<descubre >>. En la práctica se introduce una muestra en el inyector, donde es volatilizada inmediatamente y de donde es recogida por el gas portador y transportada a través de la columna. Los componentes de la mezcla se mueven a velocidades distintas que dependen de su volatilidad relativa y su solubilidad en la fase estacionaria. Los componentes más solubles son retenidos más tiempo en la fase estacionaria y los menos solubles atraviesan con mayor rapidez la columna.

La resolución, es decir, la separación de los componentes de una mezcla están en función de:

1. Longitud y diámetro de la columna.
2. Soporte específico y concentración de fase estacionaria.
3. Naturaleza y velocidad del gas portador.
4. Tamaño de la muestra.
5. Propiedades físicas y químicas de los componentes de la mezcla.

Cada componente de la mezcla es detectado a un tiempo específico y característico en unas determinadas condiciones de trabajo (tiempo de retención, T_B). El tiempo de retención es equivalente a la R_f en cromatografía en capa fina y se define como el tiempo transcurrido desde la introducción de una muestra en la columna hasta que sale de ella y es detectada. La detección de la señal puede conseguirse con varios tipos de detectores.

1. De conductividad térmica (TCD).
2. De ionización de llama (FID).
3. De captura electrónica (ECD).
4. De nitrógeno-fósforo (NPD).

Posteriormente, la señal es amplificada electrónicamente y registrada como una serie de picos, obteniéndose un cromatograma. El análisis cualitativo se basa en los tiempos de retención de cada pico, mientras que la intensidad de la señal (en área de pico o altura) es función de la concentración de cada componente. Así es posible la cuantificación mediante la utilización de patrones de concentración conocida, en cualquiera de las modalidades normalmente empleadas, (patrón interno, curva de calibración). La cromatografía de gases representa una de las herramientas más importantes con las que cuenta el analista desde la introducción hasta la actualidad. Sus aplicaciones al análisis cualitativo y cuantitativo son muy numerosas, habiendo desplazado las otras técnicas cromatográficas por sus ventajas que presenta. La precisión de un análisis por cromatografía de gases se sitúa por término medio alrededor de $\pm 2\%$, con un límite de sensibilidad 1-5 $\mu\text{g/ml}$. La gran cantidad de fases estacionarias disponibles y la posibilidad de trabajar a diferentes temperaturas permite su aplicación a la casi totalidad de las sustancias.⁴⁷

La limitación inicial de su aplicación, exclusiva para las sustancias volatilizables, se ha solventado con la posibilidad adicional de obtener derivados volátiles para aquellas sustancias que no lo son en principio, mediante la adición de un reactivo que forma un compuesto

intermedio volátil (proceso de derivación). Esto, junto a la utilización de distintos tipos de detectores, hace su aplicación prácticamente universal.⁴⁷

Tabla 5 Fases estacionarias utilizadas en cromatografía de gases y principales aplicaciones:⁴⁷

Fases Estacionarias	Tipo	Mínimo	Máximo	Polaridad	Aplicaciones
Apiezon al 10%-KOH 10%	Hidrocarburo	50	250	Apolar	Anfetaminas
Carbowax al 10%	Poliglicol	60	259	Polar	Uso general
Carbowax al 0.2%	Poliglicol	40	150	Polar	Compuestos de C ₁ - C ₁₀
Dexsil 300 al 5%	Silicona	50	450	Intermedia	Uso general
OV-1al 3%	Metil-silicona	100	350	Apolar	Uso general
PPE-20 al 3%	Polifenil-eter	125	375	Intermedia	Tóxicos ácidos

La creación de este método permitió el avance del seguimiento terapéutico en el terreno de los antiepilépticos. (Fenobarbital pka=7.3, soluble en alcohol, éter, cloroformo), pH=10: 240 nm, pH=3:256 nm. Se le puede dosificar en forma simultánea después de extracciones en medio ácido con un disolvente orgánico (éter, cloroformo, etc.)

- El residuo de extracción.
- Se inyecta directamente, pero por la adsorción sobre los grupos Si-OH y Si-O-Si. los picos se alargan.
- Se metila el procedimiento más simple es la metilación rápida a alta temperatura (en la práctica del inyector) Fenobarbital se metilla sobre el nitrógeno con hidróxido de trifenilamonio. Uno de los inconvenientes es la formación del producto de degradación del fenobarbital. Sin embargo, las determinaciones reproducibles se obtienen utilizando un patrón interno que se comporta de manera similar (heptabarbital ó ácido 5 fenil 5 tiol-barbitúrico para el fenobarbital.
- Los derivados metilados se separan sobre columnas clásicas OV1, OV17. La utilización de un detector termoiónico permite aumentar la sensibilidad de la dosificación y utilizar micro-muestras. La muestra que va a ser analizada es introducida en el puesto de inyección por medio de un dispositivo, automático o en forma manual con una, micro jeringa; así se pueden analizar sólidos, líquidos y gases.
- **Tiempo de Retención:** El análisis cualitativo se hace con base en los tiempos de retención requerido para que un compuesto recorra el sistema cromatográfico; en teoría

este dato debe ser útil para la identificación, pero en la práctica el número de variables que deben ser controladas para obtener valores reproducibles de tiempos de retención, limita la aplicación de la técnica; además siempre se debe disponer de una muestra auténtica de la sustancia y es posible que compuestos diferentes Posen, tiempos de retención similares son muy cercanos; en este caso es necesario recurrir a técnicas no cromatográficas como la espectrometría de masas para lograr una identificación certera. En las determinaciones cuantitativas se pueden obtener muy buenos resultados, si se emplean las técnicas adecuadas. Este análisis se basa en que el área bajo los picos es proporcional a la cantidad de compuesto en la muestra; sin embargo, se debe tener en cuenta que el detector no da igual respuesta a la misma cantidad de diferentes compuestos y es necesario hacer correcciones y/o curvas de calibración con estándares, para lograr una cuantificación confiable.⁴⁷

El siguiente diagrama representa el funcionamiento de la Cromatografía de Gases.

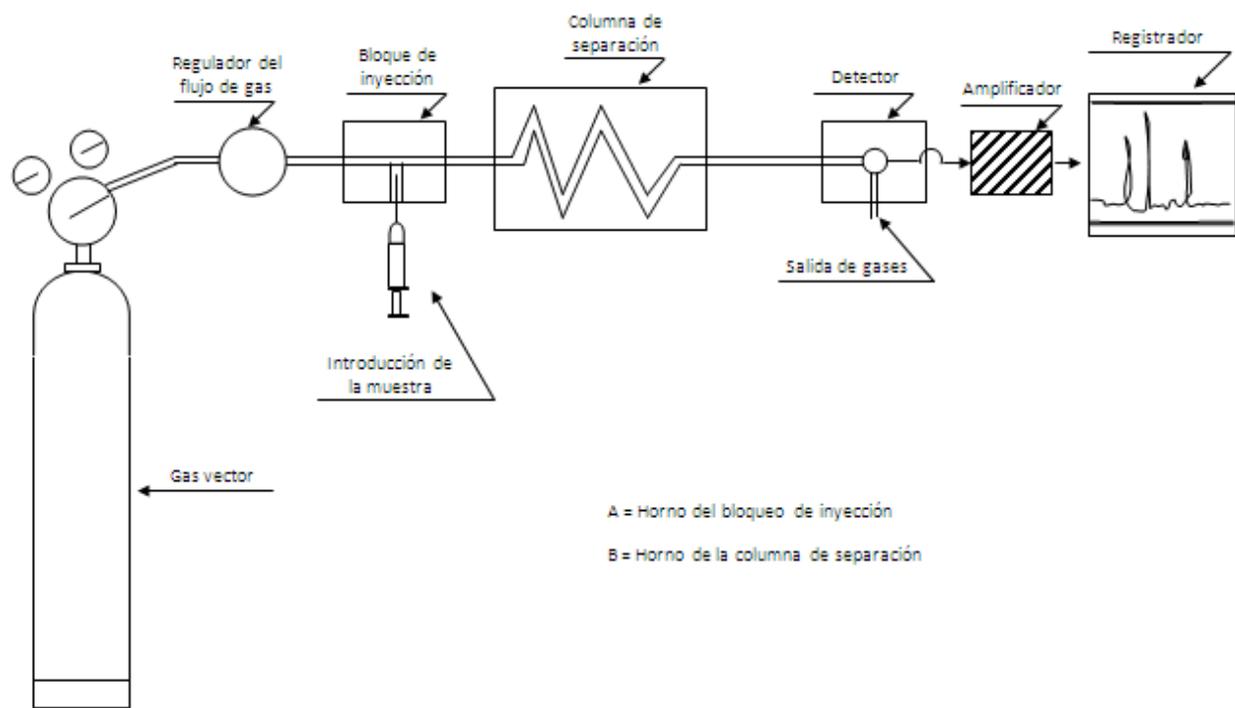


Diagrama de un cromatografo de gases ⁴⁷

Fundamento: a una temperatura dada existe un equilibrio de partición (aire-material biológico) para una sustancia volátil determinada, utilizándose agentes liberadores del tóxico. Luego, el tóxico presente en la fase vapor es analizado por cromatografía gaseosa (CG).²⁷

Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia:

En cromatografía líquida de alta eficiencia, (CLAE), la muestra es disuelta en un solvente líquido y forzada por presión a atravesar la columna cromatográfica donde es resuelta: la extensión de la resolución es importante y depende del grado de interacción entre el soluto y la fase estacionaria y móvil. Esta interacción puede ser modificada según la selección de solventes y columnas, los componentes pasan al detector y la respuesta de éste es dibujada por un registrador (cromatograma). La CLAE posee las ventajas de la C.G. y sus limitaciones están relacionadas básicamente con los altos costos de los solventes y su instrumentación.²⁸

Los métodos cromatograficos son más específicos, pero menos rápidos y su manejo requiere entrenamiento especial lo que les hace menos adecuados para el laboratorio de urgencias.

La cromatografía de gases tiene la sensibilidad analítica adecuada, aunque presenta problemas debido a la presencia de productos de descomposición por las altas temperaturas a que se opera. La derivatización del compuesto puede minimizar estas dificultades¹⁸.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) parece ser el método analítico que ofrece una determinación más precisa y exacta, considerándose el método de referencia^{19,21,2}

La diferencia entre la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y la cromatografía en columna convencional es únicamente de tecnología y de conocimiento de los parámetros que gobiernan la separación. El cromatógrafo líquido es prácticamente igual que el cromatógrafo de gases, con la única diferencia es de sustituir la botella de gas a presión (fase móvil) por un sistema de impulsión de líquido (bomba) y de que el sistema de inyección (cámara de vaporización en cromatografía de gases). Es un simple introductor de muestras en cromatografía líquida. Presentan en común: la columna permanente y reutilizable de alta eficacia, el sistema de termostatación de la columna (no imprescindible en CLAR). La circulación continua de eluyente, la detección en continuo a nivel de microgramo de los solutos eluidos y la visualización gráfica del resultado en el < cromatograma >. El tratamiento cualitativo y cuantitativo es esencialmente idéntico y la precisión es mayor en la Cromatografía Líquida. Con la Cromatografía de gas líquida (CGL) se pueden separar eficazmente aquellas sustancias que posean una presión de vapor suficiente, sin sobrepasar los 350 ° C y sin sufrir descomposición térmica apreciable. La CLAE es aplicable en general para las sustancias que posean un peso molecular medio o alto (> 250 hasta 10⁶). Ambas técnicas poseen su zona exclusiva:

1. Gases permanentes y sustancias volátiles: GLC.
2. Compuestos de alto peso molecular y polares: CLAR

No obstante, existe una gran zona intermedia de solapamiento de ambas técnicas. En esta parte la cromatografía líquida posee la gran de poder aplicarse a todas aquellas sustancias susceptibles de alterarse térmicamente, permitiendo en general separaciones mucho más rápidas de grupos de sustancias dispersas desde el punto de vista funcional. ⁴⁷

Espectrometría de masas:

La espectrometría de masas está relacionada con la producción de iones y la subsiguiente fragmentación de las moléculas, así como la determinación de las razones masa/carga (m/z) y la abundancia relativa de los iones producidos. Por tanto, está relacionada con una propiedad fundamental de la materia, a saber, la verdadera composición molecular, más que con la absorción o emisión de luz. Los grupos funcionales de una molécula determinan la fragmentación, de manera que, conociendo la estructura de la molécula, es posible predecir el patrón de la fragmentación. Inversamente, conociendo el patrón de fragmentación se puede sugerir una estructura para la molécula original. Además, la técnica permite determinar el peso molecular lo que constituye la información más valiosa de un espectro de masas. Inicialmente la espectrometría de masas estaba restringida a la determinación de estructuras de metabolitos y la caracterización de compuestos que no podían ser identificados por los medios convencionales. Pero ello requería el manejo y la interpretación de los datos por especialistas en esta técnica. La aparición de grandes bibliotecas de espectros y la disponibilidad de equipos más asequibles y fáciles de manejar han permitido la utilización rutinaria de esta técnica en los laboratorios de Toxicología.

◦ Sus aplicaciones son fundamentalmente cualitativas, aunque también pueden utilizarse con fines cuantitativos. En la actualidad la espectrometría de masas, sola o en combinación con la CG ó la CLAE, es con toda probabilidad el método más efectivo para la identificación de tóxicos y sus metabolitos.

◦ La especificidad y sensibilidad de esta técnica permiten obtener un espectro completo, y en muchos casos una identificación precisa, con menos de 50 ng de material. Las determinaciones cuantitativas permiten detecciones a nivel de picogramos e inclusive fantogramos, aunque en los análisis toxicológicos su principal aplicación es la identificación de sustancias desconocidas.⁴⁷

Ventajas e inconvenientes: Costoso, requiere de personal capacitado, acoplamiento a GC (o HPLC) más efectivo para la identificación de tóxicos y metabolitos. La C.L.A.E y la C.G. poseen las mismas ventajas y sus ilimitaciones están relacionadas con los altos costos de los solventes y de su instrumentación²⁶.

VII-DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La investigación forense de barbitúricos de acuerdo a la literatura revisada, se realiza en dos etapas:

1.a) Etapa: Es un estudio presuntivo, (pruebas rápidas) son las más sencillas y pueden realizarse desde que se toma la muestra y no requieren de materiales sofisticados se encuentran las pruebas de color, que nos sirven de orientación, siendo recomendada la prueba de Zwicker, por la presencia de color que va desde una gama de colores de purpura nos indica la presencia de un derivado barbitúrico, los tiobarbituricos dan color verde.etc.de ahí se puede partir utilizando un Screening para confirmar el tipo de barbitúrico que está presente en el líquido que analizamos, se puede utilizar una técnica inmunoquímica usando un analito correspondiente como referencia y confirmar el barbitúrico presente en la muestra.

2.a) Etapa: Se utilizan técnicas de confirmación cuantitativas para conocer exactamente la cantidad de tóxico que está presente en el organismo, la técnica obligatoria usada en forense es la Cromatografía de Gases. Esta técnica es muy usada en el análisis de barbitúrico, por las ventajas que ofrece la CG, sobre otras técnicas que son:

1. Velocidad: un análisis completo puede realizarse en tiempos relativamente cortos (30 min.), Proporcionando información para los análisis cualitativo y cuantitativo.
2. Resolución: es la capacidad de separar componentes; usando las condiciones analíticas adecuadas se pueden hacer separaciones imposibles de realizar por otros métodos.
3. Sensibilidad: esta es la mejor razón para utilizar esta técnica. Utilizando detectores selectivos se han logrado detectar cantidades mínimas.
4. Requieren de un tratamiento de la muestra antes de la inyección las cuales suelen ser más largas y extracción del fármaco.
5. La técnica de Cromatografía de gases es muy utilizada en el análisis de barbitúricos, sin embargo no se han logrado las condiciones experimentales capaces de lograr la separación de todos los barbitúricos y que se pueda identificar al tipo de barbitúrico analizado, en la actualidad se sigue investigando técnicas de validación de los mismos. Ventajas de los Screening, son más rápidas de fácil manejo, sensibilidad, y especificidad.

La técnica también tiene sus limitaciones en lo que se refiere a características de la muestra para análisis y la incertidumbre en la identificación de los componentes. Para superar las dificultades

en los análisis de muestras poco volátiles, en la actualidad se está utilizando la cromatografía líquida de alta eficiencia. Son más específicas, mayor precisión y se puede separar sustancias que tengan presión de vapor menores a 350 °C sin sufrir descomposición térmica.

Las técnicas de inmunoanálisis son más rápidas por que se utiliza una dilución de la muestra, pero con frecuencia son caras. Su desventaja Los radioinmunoensayos (RIA) fueron los primeros en desarrollarse. Sin embargo, son los que presentan más problemas de manipulación ya que se trabaja con isótopos radiactivos que presentan una serie de riesgos para la salud además de producir una serie de desechos radiactivos que hay que eliminar apropiadamente. Por ello, a pesar de su gran sensibilidad se han visto desplazados por los enzimoimmunoensayos y por los inmunoensayos fluorescencia. De todos ellos el RIA posee el mayor límite de detección (del orden del picogramo / mililitro). Sin embargo posee algunas desventajas que han llevado a su reemplazo por alguno de los demás inmunoensayos (cuyos límites de detección están en el orden de los nanogramos / mililitro). Los reactivos empleados en el RIA son de corta vida media, con mayor posibilidad de reacciones cruzadas por lo que requiere de la confirmación por otras técnicas como la CG o CLAE, ya que ofrecen un mayor límite de sensibilidad que va desde 1-5µg/ml. Una gran limitación de las técnicas de inmunoanálisis es que no se puede llevar a cabo el diagnóstico de sobredosis general por antidepresivos, ya que no permite la identificación de fármacos pertenecientes a distintos grupos relacionados químicamente como son los de nueva generación. En la siguiente tabla se hace la comparación de las ventajas y desventajas de las técnicas utilizadas en la identificación de barbitúricos en fluidos biológicos.

Screenig	Vs	Confirmación
Bajo costo		Alto costo
Rápida		Lenta
Semicuantitativa		Cuantitativa
Alta sensibilidad		Alta sensibilidad
Baja especificidad		Alta especificidad

VIII.-Conclusiones: Las técnicas cromatográficas solas, no son capaces de suministrar una identificación inequívoca de un compuesto particular y la confirmación por técnicas específicas como la espectrometría de masas es a menudo obligatoria.

Además, debemos enfatizar que no existe un método de análisis único; en los estudios forenses muchas veces una técnica clásica es lo suficientemente adecuada y no siempre requiere instrumentación sofisticada. En CG no se han logrado las condiciones experimentales para lograr la separación de todos los barbitúricos.

X.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- J. Varona. E. Escribano, JL .Martín- Calderón. Fenobarbital: Farmacocinética, toxicología [Rev. Dgn. Biol].1ed, Ed. Scielo. <[http; //Cielo.iscili.es/cielo](http://Cielo.iscili.es/cielo).22 Jul.2010.
2. - Harold, Kalant, Walter, H.E, Roschlau. Principles of. Medica Pharmacology. Nueva York: Editorial University Prees, 1998, p330-333.
- 3.- Buzo Alfredo, Fernando Sosa Miguel. Manual de Toxicología. Buenos Aires: Editorial López librerros editores. 1960 p.330-333

- 4- Robert H. Dreisbach. William O. Robertson. Manual de Toxicología clínica Prevención, Diag. Tratamiento. México: Editorial. Manual Moderno, 1998. p. 289-296.
- 5.- Fernández Chávez Intoxicación por Barbitúricos [Rev.]; Honduras: Ed.Gabinete Pericial
www.gabinetepericial.com.toxicology.
6. - Casaret and Doulls, Kent, R.Olson.MD, Toxicology the Basic Science of poisoning. Nueva York: Editorial. Mc Graw, 1999 p. 667-673
7. - Lester M.Haddad, James F.Winchester Clinical Management Of. Poisoning & drug Overdose University Michigan Editorial Sanders, Michigan. 1990 p 85-87
- 8.-Uribe González Canilo.Manual de toxicología clínica. Bogotá: Editorial.Temiz1989. Pag.110-116
- 9.-Falconer Sheridon Patterson Farmacología y Terapéutica. Michigan: Editorial. Interamericana, 1992 p 60-76
- 10.- Alex C.Somenwirth Leonard jarett Métodos y Diagnósticos del Laboratorio. Clínico. Buenos Aires: Editorial. Medica Panamericana. 1999. p355-365
11. Goodman & Gilman, Las bases Farmacológicas de la Terapéutica.Vol.1. México: Editorial Mc Graw. 19961 p. 1873-1905
- 12.- Cesar Augusto Osorio y Nieto Homicidios causados por envenenamiento. México: Ed. Porrúa, México, 1992. P305-308
- 13.-Pearson Clifton E. Meloan, Richard Safeistein. Criminalist. An Introduction to Forensic Science. Nueva Jersey: Editorial. Prentice Hall 2003 p 185-186
- 14.- Vargas Zaragoza Benjamín. Humor vítreo en la toxicología forense. [Rev.]; B.C.México.
www.criminalistic.com.toxicology. 7 Dic.2007

- 15.-Tokugawa K.Ueda K., Fujito H.And Kurokawa T. Correlation between the saliva and free serum concentration of Phenobarbital in epileptic children. European Journal of Pediatric. [145], 1986. p. 401,402.
- 16.-Lajunen LH. Spetrochemical analysis by atomic absorption and Emision.UK. The Royal Society of Chemistry.1992.p.146.
- 17.-Méndez Cervantes. Medicina Legal: Rio de Janeiro Editorial, Guanábana Koogon. 1998. p 353-355
- 18.-Peter.A.Czajka.Pharm.D James P.Duffy. Guía de Urgencias por Intoxicación, España: Editorial Salvat. 1983. p. 24.
19. - F. Freixa. Y P.A.Soler Insa. Toxicomanías un Enfoque Multidisciplinario. Barcelona: Editorial. Fontanela 1981
- 20.- Montoya Cabrera Miguel A. Toxicología Clínica. Rio de Janeiro: Editorial Mendez 1981
- 21.-Krupp Tierney Jawetz.Roe Camargo. Manual de Diagn.Clinico y Laboratorio. México: Editorial Manual Moderno. 2003
- 22.- Cabrera Boulton Rafael, Mencías Rodríguez Eusebio, Cabrera Forneiro José. Toxicología de los Psicofármacos. España: Editorial. Mosby/Dogma. 1994. p 185-221
- 23.-www.Psicoactividad Undecave net 2010
- 24.-Pomilio Alicia Beatriz. Vítales Arturo Albert Acta bioquímica clínica latinoamericana, V.40 n. 1 ed. La Plata, Ed.scie. Jul-Sep 2006.www.scielo.iscillies//scielo.
- 25.-www.united.edu.edu.tratado
- 26.-J.Varona.E.Escinano. J.L.Martin-Calderón.Fenobarbital: Farmacocinética, toxicología [Rev.Dgn.Biol].1ed.Madrid, Ed.Scielo.Ene-Mar.2001.www.Cielo.scieli.es/cielo 22 Jul. 2010
- 27.-www. adnsalta.com.ar/capitulo3 pdf. Métodos inmunológicos RIA, EMIT.
- 28.-www.criminalistyc

- 29- Garriot. C.James, Forensic Toxicology General considerations in Modern Legal Medicine. Psychiatry and forensic science Currant ^{Mc} Garry Petty T.A Davis Company. Philadelphia. 1980.
- 30.-Sadee Gertruida Wolfgang: Drug level Analytical techniques, Metabolism Pharmacokinetics J.W.and saous Inc.U.S.A.1980.
- 31.-Enrich Noji.Gabn D.Kelan Manual of toxicology Emergency. Year book. Medical Publish.Inc.U.S.A.1999
- 32.-Sunshine Irving, Recent Development in therapeutic drug monitoring and clinical toxicology. Marcel Decker U.S.A. 1992.
33. - Garriot C.James. Forensic toxicology General, considerations in Modern Legal Medicine Psychiatry and forensic Scent. Currant. Mc Garry, Petty T.A. David's company Philadelphia 1989.
34. - Clarke.E. Isolation and identification of drug in Pharmaceutical body fluids and postmortem the pharmaceutical. London 1959.
- 35.-Repeto Manuel. Toxicologia Fundamental. Barcelona Editorial. Científico Médica.1981
- 36.-[www.emidicine.com/em.drug.toxicidad de barbitúricos](http://www.emidicine.com/em.drug.toxicidad%20de%20barbit%C3%BAricos).
- 37.-[www.comite de expertos de la OMS barbitúricos](http://www.comite%20de%20expertos%20de%20la%20OMS%20barbit%C3%BAricos).
- 39.-Lietz Cruz Giuselle Análisis Toxicológico en Ciencia Forense. Lab.de Criminalística Forense Ed. EUNED. p. 41-46
- 40.-Janire Ramila Nuria. La Ciencia contra el Crimen, S.L Madrid: Editorial. Colección abierta., Marzo 2010, [www](http://www.detecciondebarbituricos.com), detección de barbitúricos en forense
- 41.- [www.hruscka](http://www.hruscka.com) Aspectos Analíticos de la Determinación de Drogas.
- 42.-[www.elsabucazo.com./modules/news/articles.Barbitúricos drogas de farmacia](http://www.elsabucazo.com/modules/news/articles/Barbit%C3%BAricos%20drogas%20de%20farmacia).17 Enero 2008
- 43.-SalazarVallejoMichel, Reralta RodrigoConcha. Tratado de Psicofarmacología Bases y Aplicación Clínica 2 ed. Ed. Médica Panamericana 2009 p373-376

44.-www.amnistiacatalunya.org.1989

45.www.barbiturico.encyclopedia medica ferato.com/wiki/index

46.-Velazquez.Farmacología básica clínica, Edit. Panamericana 2009.18 edic.

47.-Calabuig, Gisbert, Medicina legal y toxicología. España: Editorial.Salvat, 2004 p 796-812

48.-Sunshine, Irving. Methodology for anality toxicology; CRC, press.2° edic.USA 1998

49.-www.sinais

50.-www.portalesmédicos.com,Aspectos básico de la farmacología de los psicofármacos