



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN
DE CANNABINOIDES PRESENTES EN MUESTRAS DE
SANGRE POSTMORTEM**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

HERNÁNDEZ VÁZQUEZ GUADALUPE XOCHITL



MÉXICO, D.F. DE 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: FRANCISCO ROJO CALLEJAS**

VOCAL: **Profesor: PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ**

SECRETARIO: **Profesor: JOSÉ LUIS DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ**

1er. SUPLENTE: **Profesor: KRUTZKAYA JUÁREZ REYES**

2° SUPLENTE: **Profesor: BENJAMÍN PARADA DE LA CRUZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE CIENCIAS FORENSES DEL DISTRITO FEDERAL

ASESOR DEL TEMA:

José Luis Domínguez Rodríguez

SUSTENTANTE (S):

Guadalupe Xochitl Hernández Vázquez

NO IMPORTA LA DISTANCIA

*Una vez soñé
que en algún lugar
yo podría ser alguien.*

*Y también soñé
que si he de triunfar
mi orgullo aferrado
tendré que superar.*

*Un día llegaré
no importa la distancia
el rumbo encontraré
y tendré valor
paso a paso iré
y persistiré
a cualquier distancia
yo mi meta alcanzaré.*

*Sé que estaba ahí
al fin la encontré
aunque tarde una vida
yo jamás renunciaré.
Más allá de toda gloria
del orgullo y el valor
el poder siempre estuvo
en mi corazón.*

*Paso a paso fui
y persistí
no importo la distancia
yo mi meta logré.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi papá, el cual fue mi Rocky Balboa durante todo este tiempo al repetirme de mil maneras: “NI TÚ, NI YO, NI NADIE GOLPEARÁ TAN DURO COMO LA VIDA, pero no importa que tan duro lo hagas, no importa lo duro que resistas y sigas avanzando, ASÍ ES COMO SE GANA y si sabes cuánto vales sal a buscar lo que mereces, pero debes de ir dispuesto a que te den de golpes, NO A CULPAR A OTROS Y DECIR NO SOY LO QUE QUIERO SER POR ÉL, POR ELLA O POR NADIE, los cobardes lo hacen y TÚ NO LO ERES TÚ ERES LA MEJOR”. “TE AMO PAPÁ”.

A mi mamá, mi hermosa amazona, mi guerrera, mi superheroína, a ti es a quien AGRADEZCO LA INMENSA ALEGRÍA DE VIVIR. Tú eres quien ha sembrado en mí los valores más profundos y puros como el amor, el respeto, la fidelidad, la compasión, el perdón, etc., GRACIAS POR ESE AMOR INCONDICIONAL, por apoyarme aun sabiendo que estoy cometiendo un error. ERES MI PILAR. Es para mí todo UN ORGULLO DECIR, que TÚ ERES MI MAMÁ. “TE AMO CON TODA EL ALMA”.

El amor que tú me das es incomparable, y no tengo palabras para agradecer que a lo largo de todos estos años juntos ese amor fue más que constante, no solo eres mi mejor amigo, también eres mi cómplice, mi protector, MI PAPIRRIQUI ADORADO, MI AMADO ESPOSO. TE AMO TOÑIS, agradezco a la vida por ponerte en mi camino, por esas bajadas que nos hicieron darnos cuenta que no era un simple capricho el querer estar juntos. También agradezco a esos pantalones bien fajados tuyos por echarse el paquete casarse con una morra con complejos, miedos, y problemas mentales que aun estando a mitad de carrera universitaria dijeron: SÍ, ACEPTO Y VOY CON TODO, PORQUE TE AMO. Amor mío, como siempre te digo: “CONTIGO HASTA EL INFINITO, ERES EL AMOR DE MI VIDA Y SOY LA MUJER MÁS FELIZ DEL MUNDO, PUES TÚ ERES MI MUNDO”.

Para mi hermana y sobrina, no solo les quiero agradecer el hecho de estar a mi lado, sino también les quiero reconocer el que toleraran mis altas y bajas, por estar siempre fuertes, apoyándome en cada alegría y desacierto, por sonreír cada que mi espíritu estaba a punto de desfallecer. USTEDES DOS TAMBIÉN SON MI MOTIVACIÓN DIARIA para salir adelante, GRACIAS MIS NIÑAS, por dejarme no solo ser su hermana y tía, sino también por déjame ser su mamá chiquita, SIEMPRE VOY A ESTAR para apoyarlas y velar por ambas; LAS AMO.

Para mi familia adoptiva Yáñez Gallegos los agradecimientos son pocos, el reconocimiento es lo que se merecen. MAMÁ YOLI, claramente lo dijiste: YO SOY TÚ HIJA EXTRAVIADA, no sabes el orgullo que siento cuando dices eso, me hace ser mejor persona y no fallar para que te sientas feliz de decir: “ESA ES MI HIJA”. Mamá Patty, tú también has sido mi refugio cuando tengo mis cuitas, eres una gran mujer, gracias por hacerme parte de tú familia, por encomendarme todos los días al supremo, por confiar en mí y decirme: YO SÉ QUE TÚ PUEDES.

A mis BELLAS CUÑADAS ADRIANA Y MIREYA, las cuales llevo en mi corazón; son un gran ejemplo a seguir, gracias por enseñarme a ser fémica y recatada, por demostrarme que si lucho por mis objetivos, éstos serán logrados. Gracias por hacerme sentir muy orgullosa cuando me presentan con sus amistades como su cuñada y sonreírme cada que me ven achicopalada, por esos abrazos tuyos Mireyita y por esas palabras de aliento tuyas Addy. LAS QUIERO INFINITO.

Para mis grandes hermanos de vida: Jaime te adoro hermano gracias por tus sonrisas; manis María te llevo en el corazón a cada palpitar, muchas gracias por estar siempre constante y abierta a mis pensamientos; Elizabeth, Jossue y Juan gracias por esas risas y porras para que todos salgamos adelante; y sobre todo para ti Chino que nunca dejaste de confiar en mí, que me alentaste para continuar en este sendero y que me tomaste de la mano como hermano mayor enseñándome el valor de una verdadera amistad. GRACIAS.

Gracias a mi GRAN MAESTRO y consejero el Q. F. B. Adrián Waldo Capetillo, por confiar en mí, por siempre impulsarme para salir adelante a pesar de las adversidades que se podrían presentar. Fue un honor trabajar con un hombre responsable, fiel a su trabajo y convicciones, un gran mentor y excelente ser humano.

Quiero dar un reconocimiento y agradecimiento especial a mi asesor de tesis el Q. F. B. José Luis Domínguez Rodríguez, el cual puso su confianza en mí para el desarrollo de este proyecto a pesar de que yo ya me había dado por vencida. Él a través de una sonrisa y broma me enseñó qué es ser un PERITO QUÍMICO. No solo me mostró el manejo de los equipos y sus fundamentos, sino que también me hizo comprender que no solo se necesita un título o una especialidad, sino que es necesario el conocimiento con el cual nadie nace sino que se consigue con el paso de los años, que si destacas es porque luchaste por ello y te preparaste para ello; que de los errores se aprende, que la persona que quiere aprender también pregunta y no se queda con la duda, que son necesarios los conocimientos adquiridos dentro de la carrera y hay que ponerlos en práctica, no solo guardarlos en el baúl de los recuerdos. Pero sobre todo, me enseñó y demostró que lo que puso como conclusión en su propia tesis de titulación es que: la mejor carrera para ejercer las Ciencias Forenses y la que esta mayormente capacitada es un QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

Me tomo la libertad de dar las gracias a la Q. F. B. María de Lourdes Aburto Juárez (experta en cromatografía), la cual siempre estuvo al pendiente de mi proyecto y estaba en este instituto. Química, fue un placer colaborar con usted, me llevo todos sus consejos y enseñanzas, los cuales no dudo ni por un instante poner en práctica. Agradezco su tiempo, esfuerzo y dedicación, por convertirse en mi maestra y guía.

De una manera análoga quiero dar las gracias al M. en C. Carlos Enrique Díaz Otáñez y al I. Q. Bernabé Hernández Santos por su apoyo incondicional, sus consejos, pero sobre todo por su amistad y enseñanza, las cuales pusieron a

prueba mis capacidades ya no sólo como alumna, sino también como una profesional que puede ser líder y estar a cargo de todo un proyecto.

QUIERO HACER UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL AL: INSTITUTO DE CIENCIAS FORENSES Y SU PERSONAL. Gracias a esta institución y el apoyo de todos los que laboran en él, fue posible que hoy se pueda hacer realidad este sueño que tanto anhelé.

A mi segunda casa, la Honorable Facultad de Química-UNAM, gracias por abrirme sus puertas, aún estando yo renuente por aceptar y estar en ella, estoy segura que siempre será mi hogar. Fue un honor estar entre sus pasillos y tener una matrícula que me recordará mi estadía. Gracias por dejarme conocer a tus respetables profesores y alumnos, los cuales me transmitieron no solo esos conocimientos científicos, sino también experiencias de vida y de superación.

¡QUÍMICA, UNAM, GOYA, GOYA, CACHÚN, CACHÚN, RA, RA, CACHÚN,
CACHÚN, RA, RA, GOYA!... ¡UNIVERSIDAD!

DEDICATORIA

A mis padres **Guadalupe** y **Cipriano** por recorrer el camino de la vida, uno al lado del otro sin jamás desmayar, siguiendo por la ruta que les marcó el destino, apoyándome siempre para no tropezar, por confiar y creer siempre en mí.

A mi esposo **Marco Antonio** por su apoyo físico y moral, por amarme a cada momento aun a pesar de mi cansancio y desvelo, esto es completamente dedicado a ti, a este amor, a esta unión que ha sido más fuerte que cualquier aleación, por dedicarme tu amor y déjame ser tu mundo, cuando seamos padres haré que ellos se sientan orgullosos de este gran hombre, tanto como yo lo estoy. TE AMO.

A mi hermana **Viviana** y mi sobrina **Zyanya Akari**, por ser ese motor constante para salir adelante, por esas sonrisas que no me dejaban vencerme y ese apoyo incondicional ante cualquier decisión que tomara de mi vida.

A mi abuelita **Geno**, por su dedicación aun a pesar de sus limitantes. También quiero dedicar este logro a mis abuelitos **Trini, Juan y Emilia**, por darme su amor, un linaje y un hogar, ustedes son el pilar de la que ahora es mi familia. Dios los tiene con él, pero mi corazón está con ustedes por la eternidad, el día que los vuelva a ver les daré ese abrazo, aplauso y las gracias que tanto se merecen. Por ustedes y para ustedes este triunfo.

Quiero dedicar esta tesis a cada uno de los que hicieron posible la llegada a mi meta, no quisiera dejar a nadie fuera, incluso dedico esto a ti lector por tomarte el tiempo de hojear estas líneas.

Pero también quiero dedicarme a mi **Guadalupe Xochitl** este éxito logrado, al igual que a mi descendencia, quiero que sepan que si yo pude lograrlo ustedes también lo lograrán en su momento.

Para ustedes y para mi... GRACIAS.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	2
	II.I TOXICOLOGÍA FORENSE	3
	II.II SISTEMA ANALÍTICO TOXOCOLÓGICO	4
	II.III PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	4
	II.III.I Pretratamiento. Desproteínización e hidrólisis	5
	II.III.II Métodos de extracción	6
	II.IV ANÁLISIS INSTRUMENTAL	10
	II.IV.I Técnicas analíticas presuntivas	10
	II.IV.II Técnicas analíticas confirmativas	12
	II.IV.II.I Cromatografía	12
	II.IV.II.II Fundamento teórico	13
	II.IV.II.III Detectores	13
	II.IV.II.IV Cromatografía de gases	15
	II.IV.II.V Espectrometría de masas	17
	II.IV.II.VI Acoplamiento, cromatografía de gases-espectrometría de masas	18
	II.V DROGAS DE ABUSO	21
	II.VI MARIHUANA (<i>Cannabis sativa</i>)	22
	II.VI.I Panorama Internacional y Nacional del consumo de <i>Cannabis</i>	22
	II.VI.II Generalidades de la marihuana	23
	II.VI.III Química de los Cannabionoides	25
	II.VI.IV Farmacocinética	28
	II.VI.V Farmacodinamia. Mecanismo de acción	31
	II.VI.VI Análisis toxicológico	32
III.	OBJETIVOS	34
	III.I OBJETIVO GENERAL	34
	III.II OBJETIVOS PARTICULARES	34

IV. HIPÓTESIS.....34

V. METODOLOGÍA.....35

V.I MATERIAL.....35

V.II EQUIPO.....35

V.III REACTIVOS.....35

V.IV PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES.....36

V.V MUESTRA BIOLÓGICA.....36

**V.VI METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA E
 IDENTIFICACIÓN DE CANNABINOIDE.....36**

VI. RESULTADOS.....42

VII. ANALISIS DE RESULTADOS.....53

VIII. DISCUSIÓN.....56

IX. CONCLUSIONES.....57

X. PERSPECTIVAS.....57

XI. BIBLIOGRAFÍA.....59

XII. ANEXO.....63

XII.I ABREVIATURAS.....63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Datos tomados con base en Extracción en fase sólida de Cromlab.....	9
Cuadro 2 Concentración de drogas para análisis preliminar.....	12
Cuadro 3. Principales cannabinoides de relevancia forense presentes en la planta <i>Cannabis sativa</i>	28
Cuadro 4. Muestras de sangre con resultados positivos en la detección de THC con EMIT. Las columnas coloreadas se consideran como las muestras control para análisis en el CG/MS.....	43
Cuadro 5. Cannabinoides detectados en los productos de las muestras control obtenidos mediante la técnica de extracción en fase sólida con derivatizante (ii) y sus respectivos tiempos de retención.....	53

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Organización del Laboratorio de Toxicología Forense del INCIFO con base a Sistema Analítico Toxicológico.....	4
Diagrama 2 Productos derivados de las plantas pistiladas de <i>Cannabis sativa</i> ...	24
Diagrama 3 Sistema Analítico Toxicológico aplicado en el estudio.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fundamento De La Técnica Inmunoenzimática Múltiple (Emit) (A) Sin Analito Adicional Y (B) En Presencia De Analito. Datos Tomados Con Base A Fundamentals Of Analytical Toxicology De Flanagan.....	11
--	----

ÍNDICE DE ILUSTRACIÓN

Ilustración 1. Detectores sensibles a la masa y a la concentración (tomado del Manual Cromatografía de Gases de PerkinElmer).....	14
Ilustración 2. Etapas del proceso de GS/MS (tomada en base al Manual PerkinElmer).....	19
Ilustración 3. Equipo V-Twin.....	38
Ilustración 4. Muestra número 2908 con presencia de Δ^1 -tetrahydrocannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.....	45
Ilustración 5. Muestra número 2908 con presencia de Cannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.....	46
Ilustración 6. Muestra número 2908 con presencia de Δ^9 -tetrahydrocannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.....	47
Ilustración 7. Muestra número 3198 con presencia de Δ^1 -tetrahydrocannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.....	48
Ilustración 8. Muestra número 3198 con presencia de Cannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.....	49
Ilustración 9. Muestra número 3198 con presencia de Δ^9 -tetrahydrocannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.....	50

Ilustración 10. Muestra número 2857 con presencia de Δ^1 -tetrahydrocannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.....	51
Ilustración 11. Muestra número 2857 con presencia de Cannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.....	52

I. INTRODUCCIÓN

En México, como en el resto del mundo, el consumo de drogas muestra periodos de aumento y de decremento. Hacia el año 2008 se encontraron crecimientos significativos en el consumo en comparación con lo que ocurría 6 años antes; en los tres años siguientes (2011) el consumo se ha estabilizado, no hay cambios significativos en los índices de consumo (Encuesta Nacional de Adicciones, 2011).

Los datos de la Encuesta Nacional de Adicciones 2011 muestran la necesidad de reforzar las acciones desarrolladas para reducir la demanda de drogas; por ello es importante ampliar la política de prevención y tratamiento y dirigir más acciones hacia la población adulta joven. Sin embargo el panorama reflejado por el informe Mundial sobre las Drogas 2010 de la Oficina de las Naciones Unidas contra las Drogas y el Delito es verdaderamente desolador. El consumo mundial de estupefacientes no disminuye a pesar de todos los esfuerzos y recursos internacionales y locales empleados para detenerlo; parece avanzar y readaptarse, evolucionando según el clásico patrón de oferta-consumo y libre competencia entre productos (González Garrido, y otros, 2013).

Las consecuencias relacionadas con el empleo de sustancias psicotrópicas y estupefacientes como la marihuana, han sobrepasado los límites convencionales de la salud pública, pues tiene además serias repercusiones sociales vinculadas a conductas delictuosas. México se ubica entre los países con mayor aumento de la tasa de suicidio entre los últimos años. En el año de 1970, la tasa de muerte por suicidio era de 1.13 por 100 000 habitantes y en el 2007 pasó a 4.12. El consumo y abuso de alcohol y las drogas ilegales se han considerado como el segundo factor de riesgo para presentar conductas suicidas, después de las depresión. Sin embargo, no queda clara la relación entre el consumo y abuso de sustancias y las conductas suicidas, ni las bases neurales subyacentes a ambas, o su interacción (Sánchez Loyo, y otros, 2013).

En el 2009, el Servicio Médico Forense (SEMEFO), ahora Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO), proporcionó información sobre la presencia de sustancias en los casos de personas que murieron de manera violenta o súbita, encontrándose que el 24.4% del total de defunciones ocurrieron bajo la influencia de algún tipo de sustancia como el alcohol y drogas ilegales, teniendo como causas más comunes muertes ocasionadas por arma de fuego, accidentes de tránsito y asfixia (Secretaría de Salud, 2012). Sin embargo, y como ya se mencionó no se ha encontrado una clara correlación entre el consumo de algún tipo de droga ya sea legal o ilegal y la causa de muerte del occiso.

Tomando en cuenta estas circunstancias, el laboratorio Químico Toxicológico juega un papel fundamental en el esclarecimiento del estado real de intoxicación del occiso, convirtiéndose así en una unidad de servicios auxiliares a la administración de Justicia.

Para este fin, el laboratorio de Toxicología Forense se vale de recursos instrumentales presuntivos y confirmativos que ponen de manifiesto la presencia o ausencia de sustancias de relevancia toxicológica. Sin embargo, aunque se cuente con la mejor tecnología, la preparación de la muestra es y seguirá siendo un paso vital, pues de dicho procedimiento dependerá la posterior aplicación de técnicas analíticas (Stashenko, y otros, 2011).

Por tanto, el presente trabajo tiene por objetivo plantear una técnica de extracción para cannabinoides en muestras de sangre postmortem, que permita aplicar la técnica confirmativa de *Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría a Masas* (GC/MS), con el fin de aportar datos confiables del consumo de marihuana por parte del individuo antes de su muerte.

II. MARCO TEÓRICO

II.I TOXICOLOGÍA FORENSE

La definición más sencilla de Ciencia Forense, de acuerdo a la *Forensic Science Society* del Reino Unido, que la define como la aplicación de los conocimientos científicos a cuestiones legales, la ciencia Forense es capaz de hacer <<hablar>> al muerto descubriendo, recogiendo, analizando e interpretando los indicios que en el cadáver se encuentran (Hombreiro Noriega, 2013); (Otín del Castillo, 2010).

La ciencia forense incluye disciplinas tales como:

- Química
- Toxicología
- Patología
- Genética
- Necropsia
- Psicología
- Entomología
- Entomotoxicología
- Clínica Médico Forense

(Instituto de Ciencias Forenses, 2010)

Una de las ramas de la ciencia forense como ya se mencionó es la Química Forense, que se encarga del análisis tanto de sustancias no-biológicas, tales como pintura, vidrio o líquidos, trazas de pólvora, así como de muestras de origen biológico (análisis toxicológicos) (Valdebenito Zenteno, y otros, 2014). El laboratorio químico toxicológico es un área auxiliar de dicha rama, que se encarga de determinar la ausencia o presencia de sustancias potencialmente tóxicas que contribuyen a la muerte de un individuo (García Rodríguez, y otros, 2005).

En el laboratorio Químico Toxicológico del INCIFO se hace la determinación de alcohol etílico, pues es una de las principales causas de muerte tanto directa como indirectamente, su identificación y consecuente cuantificación se hace mediante el uso del Cromatógrafo de Gases. En el caso de drogas de abuso, las normas

internacionales marcan la identificación tanto de metabolitos, en este caso utilizando la Técnica Inmunoenzimática Múltiple (EMIT), así como la identificación de los principios activos, con el uso del Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.

II.II SISTEMA ANALÍTICO TOXICOLÓGICO

Para llegar a cualquier análisis toxicológico, se ha creado un Sistema Analítico Toxicológico (SAT) que se define como el conjunto de procedimientos analíticos encaminados a poner de manifiesto la presencia o ausencia de sustancias de relevancia toxicológica en una muestra determinada (García Rodríguez, y otros, 2005), a continuación, el Diagrama 1 presenta el SAT del Laboratorio de Toxicología Forense del INCIFO.

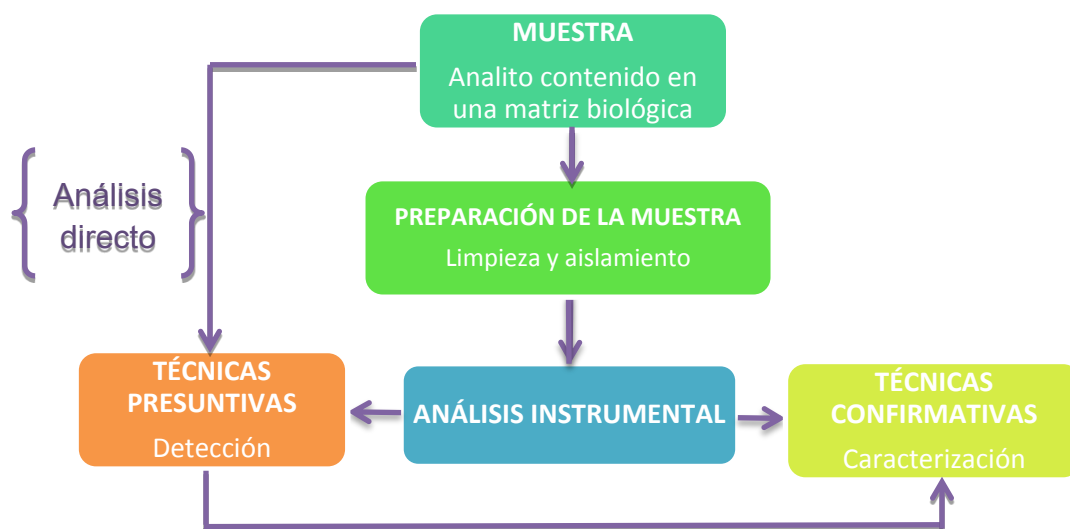


Diagrama 1. Organización del Laboratorio de Toxicología Forense del INCIFO con base a Sistema Analítico Toxicológico

II.III PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Aunque algunas técnicas analíticas pueden ser aplicadas directamente sobre la matriz original en que se encuentra el analito, a menudo es necesario realizar alguna forma de tratamiento a la muestra antes de su análisis con el objetivo de

eliminar compuestos que puedan interferir en la detección del analito de interés, mejorando así la sensibilidad del método (García Rodríguez, y otros, 2005).

El proceso de preparación empleado dependerá de varios factores entre los que figuran la naturaleza de la matriz (origen, estado de agregación, homogeneidad, estabilidad y representatividad) y del analito a aislar (su volatilidad, polaridad, reactividad y termoestabilidad, en qué concentración se encuentra y cómo está distribuido en la matriz); el propósito mismo del análisis; la necesidad de la confirmación de la estructura química del analito (identificación por técnicas espectroscópicas); la premura del análisis, es decir, qué tan urgente es el resultado (por ejemplo, para determinar un tipo de veneno o sustancia tóxica); las implicaciones legales que pueden representar los resultados de los análisis obtenidos (por ejemplo, en campos forense, ambiental, control de doping). Por último, es importante saber si el método de extracción es conocido, regulado o debe ser establecido, optimizado y validado. Para los análisis de muestras de diferente naturaleza por GC-MS, lo más importante es tenerlas libres de componentes no compatibles con esta técnica y suficientemente concentrado, para que los analitos se encuentren en una concentración conmensurable con los niveles mínimos de detección/cuantificación del sistema GC-MS respectivo (Stashenko, y otros, 2011). A continuación, se describen algunos procesos de preparación de la muestra:

II.III.I Pretratamiento. Desproteización e hidrólisis.

En las muestras biológicas, muchas de las sustancias de interés toxicológico y sus metabolitos pueden encontrarse unidos a grasas, proteínas celulares o en forma de conjugados unidos a proteínas plasmáticas. Por lo regular en un análisis toxicológico, interesa valorar la totalidad del analito presente en la muestra; para ello es necesario romper las uniones proteicas e hidrolizar los ésteres conjugados (Repetto Jiménez, y otros, 2009).

Cuando se trabaja con sangre total, antes de efectuar el procedimiento de extracción, inicialmente se puede realizar una desproteización, y posteriormente

se recomienda llevar a cabo una hidrólisis de conjugados por vía química (ácida o alcalina) o enzimática, con el objetivo de aumentar el rendimiento de la extracción de tóxicos como los opiáceos, fenotiazinas, cannabinoides, etc. (Flanagan, y otros, 2007) (Repetto Jiménez, y otros, 2009).

II.III.II Métodos de extracción.

La extracción, cuando el término es usado farmacéuticamente, implica la separación de fracciones medicinalmente activas de tejidos vegetales o animales de componentes inactivos o inertes utilizando solventes selectivos en procedimiento de extracción estándares (Remington, 2000). Los métodos de extracción son útiles para el aislamiento de los analitos del resto de la matriz biológica antes de aplicar un análisis instrumental específico.

Las extracciones pueden efectuarse por técnicas de extracción líquido-líquido (ELL), extracción sólido-líquido (ESL) o extracción en fase sólida (EFS).

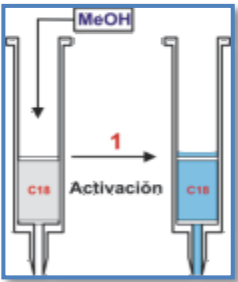
Extracción líquido-líquido (ELL). Este método consiste en la distribución o reparto de un soluto entre dos fases líquidas inmiscibles entre sí, dependiendo de sus características de pKa y su solubilidad en ambas fases; así un compuesto en su forma no ionizada tendrá mayor afinidad por la fase orgánica que por el medio acuoso de la muestra biológica, en tanto que los compuestos ionizados y algunos componentes biológicos, tales como las proteínas, permanecen en la fase acuosa (Karch, 1998). Para obtener un alto porcentaje de recobro es recomendable llevar a cabo extracciones consecutivas empleando varias porciones de solvente orgánico.

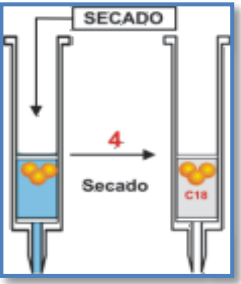
Extracción sólido-líquido (ESL). El principio de extracción consiste en la selección de un solvente capaz de disolver el compuesto deseado, así como dejar los no deseados en la fuente de naturaleza sólida. Se usa entonces para extraer un producto natural a partir de su fuente natural. La extracción (ESL) suele ser mucho más efectiva cuando se hace de

manera continua calentando el disolvente de extracción en un sistema cerrado, el paso del disolvente orgánico con parte del producto extraído permite que el mismo disolvente orgánico vuelva a ser vaporizado, repitiendo un nuevo ciclo de extracción mientras que el producto extraído no volátil, se va concentrando en el matraz (Lamarque, y otros, 2008); (Ullauri, 2010).

Extracción en fase sólida (EFS). Esta técnica es muy eficaz y simple, la cual al mismo tiempo es rápida y económica. Consiste en un lecho adsorbente de partículas gruesas mantenido entre dos discos porosos en un tubo desechable (**cartucho empacado**). El cual permite la pre-concentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación de la misma. El componente de interés resulta retenido en una fase sólida mientras que los de inacción se eluyen (Cuadro 1).

La técnica de EFS implica seis pasos consecutivos, los cuales dependen del analito de interés:

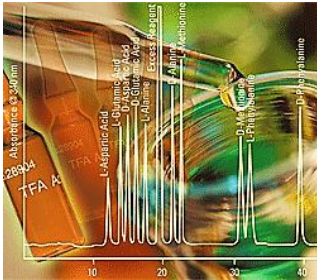
Cuadro 1. Esquema general de Extracción en Fase Sólida de Cromlab.	
<p>Acondicionamiento del cartucho</p> 	<p>La actividad del adsorbente y de los grupos funcionales se consigue al pasar un volumen de solvente o mezcla de solventes a través de la columna. Para activar adsorbentes hidrofóbicos se usa generalmente metanol o acetonitrilo, mientras que para los hidrofílicos se usa hexano o cloruro de metileno.</p>
<p>Adición de la muestra</p>	<p>Se adiciona la muestra en la parte superior del lecho de adsorbente. Los analitos de indolencia pueden pasar por la columna sin ser retenidos, y otros componentes pueden retenerse más o</p>

	<p>menos fuertemente en la superficie del adsorbente. Para obtener la máxima eficiencia se debe controlar la cantidad de fluido que circula a través del cartucho.</p>
<p>Lavado del cartucho</p> 	<p>El lavado permite la eliminación de cualquier resto de compuestos que puedan interferir manteniendo los analitos en el lecho de adsorbente. Se pueden usar solventes o mezcla de solventes de diferente tipo para mejorar la eficacia del lavado.</p>
<p>Secado</p> 	<p>Las trazas de solvente se eliminan haciendo circular aire a través de la columna durante 2 a 10 minutos, con el fin de mejorar el rendimiento de la extracción, capturar el analito de interés dentro del cartucho para su posterior recuperación en la elución</p>
<p>Elución del analito</p> 	<p>Se hace pasar un solvente adecuado por la columna para eliminar la interacción analito-solvente y eluir el 100% de los compuestos de interés. El solvente adecuado ha de tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con los de indolencia, dejándolas en el lecho de adsorbente.</p>
<p>Concentración</p>	<p>El volumen de elución ha de ser el menor posible para mantener alto el factor de concentración. Los compuestos de interés se concentran mediante la evaporación del solvente con la</p>



ayuda de una parrilla a 40°C con una corriente de nitrógeno constante, hasta sequedad. La muestra concentrada ya está lista para el análisis.

Derivatización



Es un proceso químico orientado hacia la transformación de los analitos en otras especies más compatibles para lograr un análisis satisfactorio por la técnica de GC/MS. A menudo este procedimiento es empleado antes del análisis cromatográfico con el fin de mejorar la estabilidad térmica de los analitos, ajustar su volatilidad e incrementar su detectabilidad para proveer evidencia adicional de la identidad de dicho compuesto. Generalmente, se realizan tres tipos de reacciones: la sililación, acilación y alquilación.

La combinación de BSTFA (N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) y TMCS (trimetilclorosilano) es la preferida para la trimetilsililación de alcoholes, alcaloides, aminos, aminos biogénicos, ácidos carboxílicos, fenoles, y esteroides. El BSTFA silila (añade uno o más grupos sililo a una molécula) de manera fácil a una amplia gama de grupos funcionales impedidos estéricamente. Mientras que el TMCS es un catalizador de sililación, que para hace menos polares las moléculas orgánicas y se puedan trabajar. (Sigma-Aldrich, 2000)

Cuadro 1. Datos tomados con base en Extracción en fase sólida de Cromlab

Esta técnica es la más usual en el tratamiento y concentración de muestras antes de su análisis por HPLC, GC o GC/MS (CromLab S.L., 2015)

II.IV ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Para la tipificación de cualquier sustancia tóxica contenida en una muestra, los laboratorios de Toxicología Forense siguen un proceso sistemático que implica una progresión de técnicas que van desde lo más inespecífico hasta lo más específico, realizando para ello dos categorías diferentes de pruebas, denominadas, *técnicas de screening o presuntivas* y *técnicas confirmatorias* (Karch, 1998).

II.IV.I Técnicas analíticas presuntivas.

Son técnicas empleadas para hacer una determinación preliminar y establecer la posibilidad de que un analito o grupo de analitos estén presentes en una muestra. Cabe señalar que las pruebas *presuntivas* no son suficientes para afirmar que una muestra es positiva o negativa a cualquier analito, ya que este tipo de análisis pueden resultar en falsos positivos o negativos y conducir a conclusiones erróneas debido a la baja especificidad de las técnicas empleadas (Karch, 1998).

En la actualidad, los inmunoensayos se han convertido en una opción viable para ser aplicados como técnicas presuntivas debido a su rapidez y sensibilidad. Aunque estas técnicas suelen estar diseñadas para el análisis en muestras de orina, existen trabajos en los que se demuestra la posibilidad de aplicarlos a muestras de sangre realizando, por ejemplo, un extracto metanólico de sangre total o suero, en proporciones 2:1 antes de someter la muestra al análisis inmunoenzimático (Olano, y otros, 2013).

Técnica inmunoenzimática múltiple (EMIT).

El ensayo comercial se basa en la hidrólisis de glucosa-6-fosfato (G6P) en presencia de la enzima bacteriana glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), a la cual está unido el analito. La actividad enzimática convierte la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) en su forma reducida NADH, originando

un cambio de absorbancia que se mide espectrofotométricamente a 340 nm (Flanagan, y otros, 2007).

La figura 1 ejemplifica al anticuerpo unido al conjugado enzima-analito disminuye la actividad enzimática y por lo tanto la velocidad de formación del NADH **(a)**. El analito presente en la muestra compite con el analito marcado en la enzima G6PDH por la unión al anticuerpo, lo cual incrementa la fracción de enzima libre, y con ello incrementa la velocidad del cambio de absorbancia como consecuencia de la formación de NADH **(b)** (Flanagan, y otros, 2007).

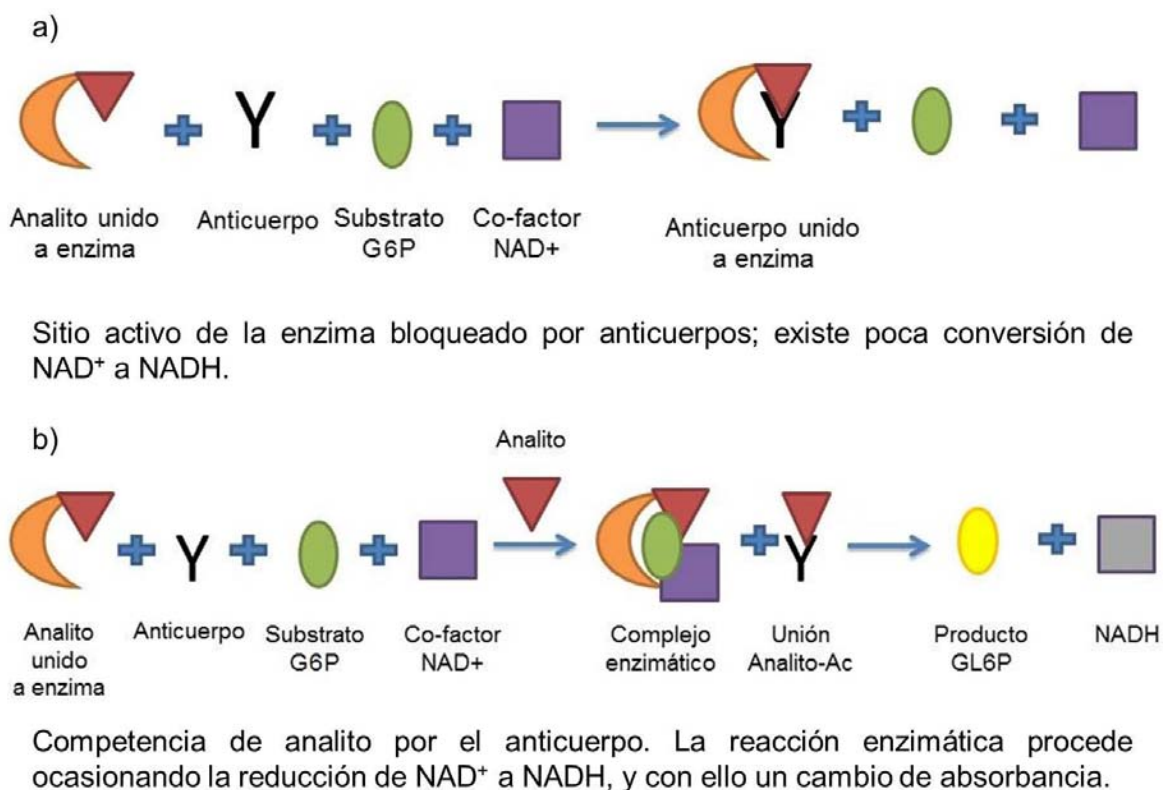


Figura 1. Fundamento de la técnica inmunoenzimática múltiple (EMIT) (a) sin analito adicional y (b) en presencia de analito. Datos tomados con base a Fundamentals of Analytical Toxicology de Flanagan.

El objetivo de estas pruebas es indicar si una sustancia está presente en la matriz biológica por lo general con la intención de confirmar su identidad con una o más técnicas selectivas; una curva de calibración es normalmente innecesaria para

estos ensayos. Sin embargo, se han establecido “límites de corte” (concentración más baja a la que el analito puede ser identificado) (Transportation, 2010), sobre todo para drogas de abuso (anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepinas, cannabinoides, metabolitos de cocaína y opiáceos), por debajo del cual la droga no se considera presente en la muestra. En el cuadro 2 se hace referencia a las concentraciones de las drogas de abuso anteriormente citadas que se identifican con la técnica EMIT y son de interés para el INCIFO.

DROGA	LÍMITE DE CORTE [ng/mL]
Anfetaminas	500
Barbitúricos	200
Benzodiazepina	200
Cannabinoides	50
Metabolitos de cocaína	150
Opiáceos	2000

Cuadro 2 Concentración de drogas para análisis preliminar.

II.IV.II Técnicas analíticas confirmativas.

Como premisa fundamental en el área científica y forense, la detección o identificación inicial de una droga o sustancia tóxica debe ser confirmada siempre que sea posible por una segunda técnica basada en un principio físico-químico diferente (García Rodríguez, y otros, 2005).

La elección del método de confirmación para una sustancia tóxica específica debe ser determinada de acuerdo con el tipo de analito, la concentración del mismo en la muestra, la naturaleza de los solventes empleados en el pre-tratamiento y la instrumentación disponible (Karch, 1998).

II.IV.II.I Cromatografía.

La cromatografía comprende un conjunto de técnicas que tienen como finalidad la separación de mezclas basándose en la diferente capacidad de interacción de

cada componente en otra sustancia. De forma general, consiste en pasar una fase móvil (una muestra constituida por la mezcla que contiene el compuesto deseado en el disolvente) a través de una fase estacionaria fija sólida. La fase estacionaria retrasa el paso de los componentes en la muestra, de forma que los componentes la atraviesan a diferentes velocidades y se separan. Cada uno de los componentes de la mezcla presenta un tiempo característico de paso por el sistema denominado **tiempo de retención**. (Baquero Quirós, 2006) .

II.IV.II.II Fundamento teórico.

La separación de los diferentes componentes de una mezcla que se encuentran en un líquido o gas es el resultado de las diferentes interacciones de los solutos a medida que se desplazan alrededor o sobre una sustancia líquida o sólida (fase estacionaria). Las diversas técnicas para la separación de mezclas complejas se fundamentan en la diversidad de afinidades de las sustancias por medio móvil (gas o líquido) en un medio absorbente estacionario (papel, gelatina, alúmina o sílice) a través del cual circulan (Moffat, y otros, 2011).

II.IV.II.III Detectores.

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna.

Los detectores se clasifican en dos categorías (Ilustración 1): los que son sensibles a la concentración y los que son sensibles a la masa (GC/MS). La respuesta de un detector sensible a la concentración sólo depende de la concentración del analito en el detector. Mientras que los detectores sensibles a la masa responden a la masa del analito que entra al detector por unidad de tiempo.

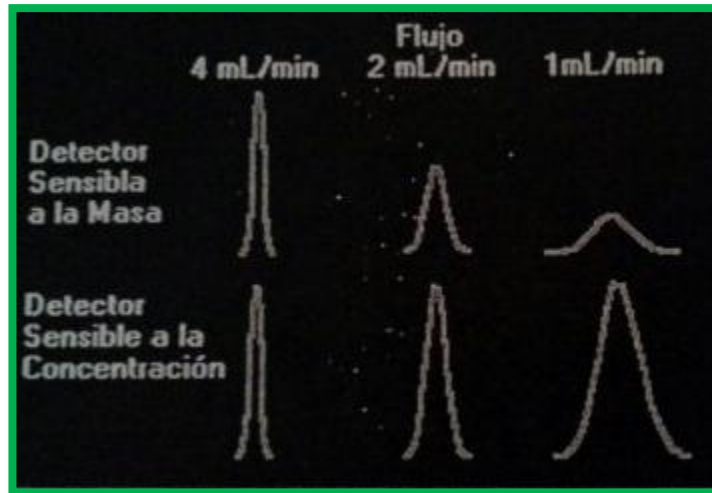


Ilustración 1. Detectores sensibles a la masa y a la concentración (tomado del Manual Cromatografía de Gases de PerkinElmer).

En general (cromatografía de gases, gases acoplada a masas y cromatografía de líquidos), un detector ideal deberá presentar las siguientes características:

- *Sensibilidad*, es necesario que pueda determinar con precisión cuándo sale analito y cuando sale sólo el gas portador. Tiene sensibilidades entre 10^{-8} y 10^{-15} g/s de analito.
 - *Respuesta lineal* al analito con un rango de cuatro órdenes de magnitud.
 - *Tiempo de respuesta breve*, independiente del caudal de salida.
 - *Intervalo de temperatura de trabajo amplio*, por ejemplo desde temperatura ambiente hasta unos $350-400$ °C, las cuales se consideran temperaturas típicas de trabajo.
 - *Estabilidad y reproducibilidad*, es decir, a cantidades iguales de analito debe dar salidas de señal iguales.
 - *Respuesta semejante o selectiva* para todos los analitos.
- (PerkinElmer, 2015)

Algunos tipos de detectores:

- Detector de ionización de flama (DIF)
- Detector de conductividad térmica (DCT)

- Detector de captura de electrones (DCE)
- Detector espectral de masas

II.IV.II.IV Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases fue la técnica cromatográfica desarrollada inicialmente para compuestos volátiles termoestables, sin embargo, su uso se ha extendido al análisis de polímeros que al calentarse producen monómeros volátiles (López Mesas, 2002).

Su rapidez y buena resolución se han aplicado al análisis de mezclas complejas de hidrocarburos, pesticidas en suelo y metabolitos secundarios provenientes de diversas fuentes naturales, drogas en sangre, disolventes de uso industrial, aromatizantes, saborizantes y fragancias.

Para una exitosa aplicación de la técnica cromatográfica se requiere una cuidadosa selección de las columnas cromatográficas empleadas, ya que estas son específicas para el tipo de análisis a realizar. Aunque no hay ninguna técnica infalible, fórmula mágica, truco o secreto para la selección de columnas, sí que hay una serie de recomendaciones y conceptos que facilitan el proceso. Hay cuatro parámetros principales que se deben tener en cuenta: fase estacionaria, diámetro, longitud y espesor de la película (Agilent Technologies, 2015).

En este tipo de cromatografía, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, esto implica que la muestra debe ser volátil y térmicamente estable.

La elución se produce por el flujo de un gas inerte, como Helio, Nitrógeno, Hidrógeno, aunque de acuerdo con el tipo de detector es necesario emplear gases específicos.

La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente será función de su distribución entre las fases, y en consecuencia su tiempo de retención en la columna.

Cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación; los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Un factor en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como consecuencia de esta diferencia de movilidad los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de detectores seleccionados.

Existen tres técnicas básicas de inyección de muestras en columnas capilares, tanto para muestras de naturaleza líquida como también para muestras gaseosas:

- *Split o modo de bifurcación*: es la técnica de inyección capilar más comúnmente usada. En esta técnica se inyectan de 1 a 5 μL de muestra y se vaporiza, pero sólo una fracción pequeña entra a la columna. Esta cantidad de muestra normalmente sobrecargaría la columna, pero la mayor parte del vapor de la muestra se saca en la corriente de purga de entrada. La fracción de material que entra a la columna se controla ajustando los flujos de purga y de columna.
- *Splitless o sin bifurcación*: en este tipo de inyección se maximiza la sensibilidad dirigiendo casi toda la muestra a la columna, por lo que resulta más adecuado para el análisis de trazas o de componentes muy volátiles.
- *On-column*: aquí se lleva a cabo en frío, eliminando la etapa de vaporización que podría producir la descomposición de los compuestos termolábiles (PerkinElmer, 2015).

II.IV.II.V Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas, es una técnica de análisis cuantitativo, de amplia utilización para la determinación de estructuras orgánicas, por si sola o en combinación con otras técnicas de espectrofotometría. Los picos cromatográficos se pueden identificar comparando sus espectros de masa con los de compuestos conocidos almacenados en la base de datos.

Otra diferencia esencial que presenta la espectrometría de masas con las espectroscopias clásicas, es que en estos últimos métodos, los procesos que originan son puramente físicos, no destructivos, de forma que la muestra utilizada para la obtención de espectro no se modifica químicamente y se puede volver a recuperar; en contraste, la espectrometría de masas, durante la obtención del espectro da lugar a procesos químicos, con lo que la muestra utilizada se destruye y no puede recuperarse; este hecho no es un inconveniente grave, ya que la cantidad de muestra necesaria para la obtención de un espectro de masas es muy pequeña, del orden de microgramos (PerkinElmer, 2015).

La espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado.

Un espectro de masas será, en consecuencia, una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.

Como ya se ha mencionado, los procesos que tienen lugar en un espectrómetro de masas, son de naturaleza química; en consecuencia, la presencia y abundancia en el espectro determina los tipos de iones identificables a partir de su masa, sea en función de la estructura química de cada compuesto (Casas, y otros, 2004), (PerkinElmer, 2015).

II.IV.II.VI Acoplamiento, cromatografía de gases- espectrometría de masas.

La cromatografía de gases es una técnica de separación que tiene la cualidad de conseguir la segregación de mezclas complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato del que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos (Gutiérrez, y otros, 2002).

La espectrometría de masas en conjunto con otras técnicas espectroscópicas (RMN, ^{13}C e IR) puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura. Por lo que, la asociación de las dos técnicas, cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS) da lugar a la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS) la cual permite la separación e identificación específica de mezclas complejas.

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que las hace muy compatibles. El único obstáculo es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en alto vacío al espectrómetro de masas.

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas.

En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma. En efecto, la corriente iónica generada da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto.

Para el caso de mezclas complejas, el cromatograma obtenido puede presentar muchos picos, que traen como resultado una difícil identificación. Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible se recurre a la técnica de detección RIS (registro de iones seleccionados). En esta modalidad de trabajo se detectan solamente algunas masas de interés. De esta forma, se aumenta la selectividad del método, reduciéndose las interferencias (Casas, y otros, 2004), (PerkinElmer, 2015).

En la GC/MS, la muestra se separa primero mediante el GC, y posteriormente se utiliza la Espectrometría de Masas para la detección. El Espectrómetro de Masas lo hace produciendo partículas cargadas (iones) a partir de los analitos presentes en la muestra y utiliza campos eléctricos y/o magnéticos para separar las partículas cargadas de acuerdo con su relación masa-carga (m/z). Los datos resultantes son procesados y analizados mediante el sistema de manejo de datos (Ilustración 2).



Ilustración 2. Etapas del proceso de GS/MS (tomada en base al Manual PerkinElmer).

A continuación se explica cada una de las etapas del proceso de GS/MS ejemplificadas en la Ilustración 2:

- i. Fuente de iones. Después de introducir la muestra en el sistema, ésta es ionizada por la fuente de iones. Los tipos de fuentes incluyen: la

ionización por impacto de electrones (IE) e ionización química (CI). En el caso preciso de esta técnica se usa la ionización química.

- ii. La interface de vacío asegura la transición de los iones desde la fuente CI al analizador de masas.

La ionización química (IC) es un método de ionización relativamente suave, donde la ionización es afectada por reacciones sobre la molécula con iones de un reactivo gaseoso generados por medio de ionización de impacto electrónico (IE) con moléculas del analito neutras.

El reactivo gaseoso es empleado con un exceso de 10^3 - 10^4 veces la molaridad del mismo. Esto puede ser logrado al usar volumen de iones bastante pequeño en comparación a las condiciones de IE.

La protonación de un analito es dependiente de la diferencia de afinidades por protones en las bases correspondientes. Por ejemplo, el CH_5^+ protona la mayoría de los analitos ($CH_4^+ + CH_4 \rightarrow CH_5^+ + CH_3^-$), mientras que el NH_4^+ es más selectivo debido a que necesita un sitio ligeramente básico en las moléculas del analito.

La muestra es introducida por medio de una sonda directa (direct probe) a una temperatura de operación de 20 a 500 °C (para sólidos y líquidos de baja volatilidad, así como líquidos y gases) o por medio del cromatógrafo de gases. Los analitos deben tener polaridad baja o media, así como estabilidad térmica. La ionización química genera iones de energía interna relativamente baja, exhibiendo un bajo nivel de fragmentación, la evaporación del analito antes de su ionización es el paso crítico.

- iii. Analizador de masas. Aquí desde la fuente de iones, los iones son transferidos al analizador de masas donde éstos son separados de

acuerdo con sus valores de masa-carga (m/z). El analizador de masas opera bajo condiciones de vacío para asegurar que los iones viajen con la máxima eficiencia.

Hay varios analizadores de masas, entre los que destacan el Analizador de Tiempo de Vuelo (TOF), el Sistema de Trampa de Iones (Ion Trap), el Sistema de MS en Tándem y el **Sistema de Cuadrupolo**, el cual corresponde a nuestro equipo de trabajo.

En este *Sistema de Cuadrupolo*, se utilizan cuatro electrodos en forma de barras formando un cuadrado para generar los campos eléctricos que filtran iones con base en su relación masa-carga (m/z) mientras viajan a través de las barras. En magnitudes y frecuencias particulares, solamente los iones de una masa seleccionada alcanzaran el detector. Alterando regularmente los campos eléctricos, las masas de todos los iones pueden ser escaneados secuencialmente de menor a mayor masa o viceversa para originar un espectro de masas.

- iv. El detector mide la abundancia de los electrones generados desde los iones para cada relación masa-carga (m/z). La mayoría de los sistemas MS utilizan algún tipo de multiplicador de electrones como un detector en combinación con un amplificador de señal. El registro de todas las cargas detectadas durante un escaneo, constituye el espectro de masas.
- v. El sistema de datos provee un solo punto de control para la instrumentación, adquisición de datos, análisis y archivo, y búsqueda de los espectros.

II.V DROGAS DE ABUSO

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las drogas de abuso como el tipo de sustancia que, en el interior de un organismo vivo, son capaces de

modificar una o varias de sus funciones, siendo susceptibles de provocar dependencia y tolerancia (Pascual Simón, y otros, 2002).

En la actualidad, el abuso de estupefacientes (sustancia narcótica que hace perder la sensibilidad; p. ej., la morfina o la cocaína) y sustancias psicotrópicas (que produce efectos por lo general intensos, hasta el punto de causar cambios profundos de personalidad) constituye uno de los principales problemas de salud pública tanto a nivel internacional como nacional, y además representa un serio problema social, al hallarse relacionado con factores asociados a múltiples figuras delictivas con consecuencias legales (Pascual Simón, y otros, 2002).

Una forma de clasificar a las drogas es mediante la división entre las drogas legales y las drogas ilegales.

- En el grupo de las *drogas legales* encontramos a los medicamentos no prescritos como los antitusivos (codeína), los medicamentos prescritos como es el caso de los barbitúricos, benzodiazepinas y a las drogas socialmente aceptadas como la nicotina, cafeína y etanol.
- Mientras que en el caso de las *drogas ilegales* se encuentran las que presentan un alto potencial para provocar dependencia como las anfetaminas, la cocaína, los narcóticos y depresores del sistema nervioso central. Dentro de este grupo también se encierra a las drogas con un menor potencial de producir dependencia, este es el caso de la marihuana y alucinógenos.

II.VI MARIHUANA (*Cannabis sativa*)

II.VI.I Panorama Internacional y Nacional del Consumo de Cannabis

Si bien la Cannabis sativa se conoce desde hace varios siglos por sus propiedades recreativas y medicinales, actualmente la marihuana, uno de sus productos, es la droga ilegal que más se consume en el mundo y su abuso es un

grave problema de salud pública, especialmente entre la población joven. Su uso se favorece y extiende por la creencia generalizada de que es menos dañina que otras drogas ilegales y que no produce daños severos como los opioides y otros psicoestimulantes. Sin embargo, está plenamente demostrado que su consumo tiene diversas consecuencias negativas para la salud, tanto a nivel orgánico, como social y psicológico. (Rodríguez Carranza, 2012).

En términos epidemiológicos, según datos de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), el *cannabis* o marihuana es la droga ilegal de mayor consumo en la población en general y a nivel mundial (Madoz Gúrpide, y otros, 2011). Asimismo, a nivel nacional se observa la misma tendencia, al ser ésta la sustancia psicoactiva ilegal que presenta el nivel de consumo más alto del país (Secretaría de Salud, 2012).

La trascendencia de este fenómeno tiene repercusiones económicas, familiares y clínicas; sin embargo, desde el punto de vista cuantitativo, la de mayor importancia es el hecho de que su consumo esté asociado a las principales causas de mortalidad y morbilidad en nuestro país (González Garrido, y otros, 2013), ya que hechos como accidentes de tránsito, muertes violentas y criminalidad ocurren cuando los individuos se encuentran bajo los efectos de esta droga.

II.VI.II Generalidades de la marihuana.

La marihuana es el pedúnculo florecido desecado de las plantas pistiladas de *Cannabis sativa* (Familia Moraceae), variedades: índica y americana. La planta para su reproducción requiere de polinización, por lo que se presentan plantas “machos” y plantas “hembras”. Las plantas machos son más pequeñas que las hembras, y mueren después de producir el polen: las hembras por su parte sobreviven al madurar la semilla; estas son recolectadas cuando los frutos no están todavía desarrollados y contienen aún toda la resina natural (fuente principal del principio activo, Δ^9 -Tetrahidrocannabinol). Los pelos glandulares en las hojas y las terminaciones de los tallos exudan una resina viscosa que cubre las flores y las hojas vecinas. Las plantas hembras secretan mucho mayor cantidad de resina que

las machos, y las que crecen en climas calientes secos, más que las que se desarrollan en regiones templadas (Pascual Simón, y otros, 2002)

Sin embargo todas las partes de la planta poseen sustancias psicoactivas que caracterizan su acción tóxica y pueden prepararse para su consumo como una pasta resinosa (hachís), triturado seco de flores, hojas y tallos (marihuana o ganja) y en forma de aceite obtenido a partir del hachís (Diagrama 2). Los compuestos químicos relacionados se denominan cannabinoles (Pascual Simón, y otros, 2002).

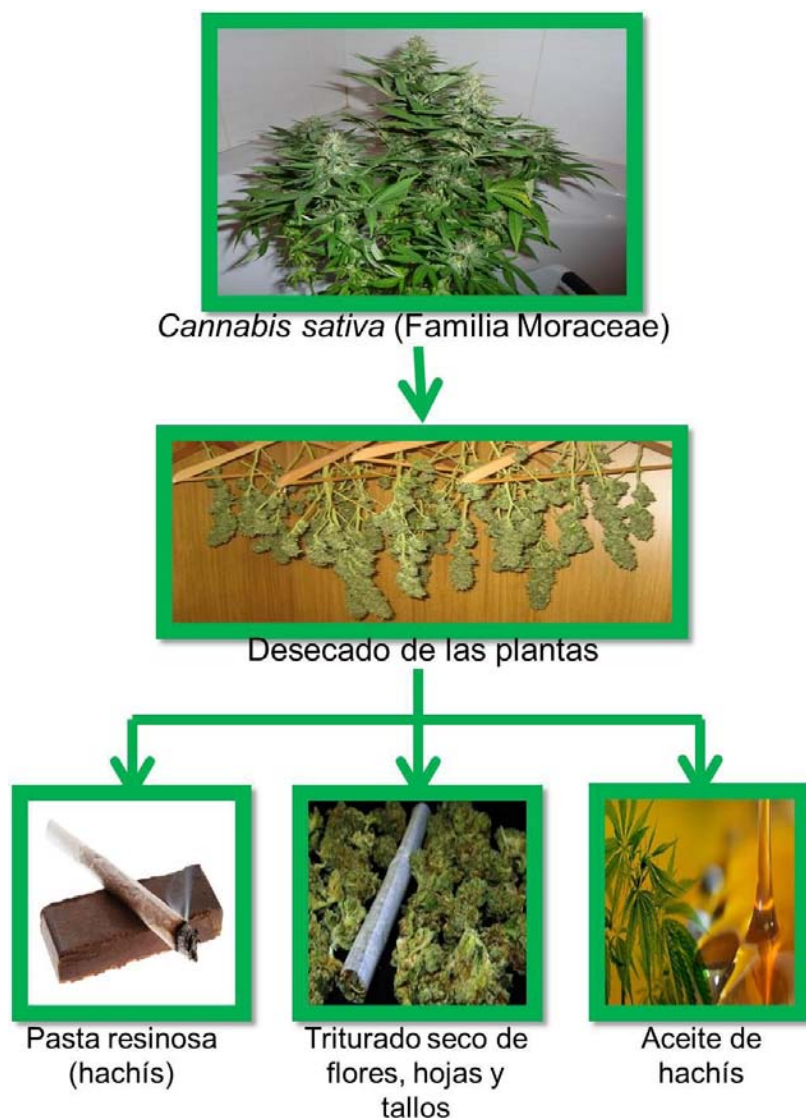


Diagrama 2 Productos derivados de las plantas pistiladas de *Cannabis sativa*.

El Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) puro es una resina sólida a 0° que se licua en forma de aceite viscoso a temperatura ambiente; es insoluble en agua y sólo se disuelve en algunos disolventes orgánicos. La cantidad de Δ^9 -THC de la planta puede variar del 0,02 al 3,5%; una marihuana de razonable calidad contiene de 0,5 o 1% o más de Δ^9 -THC por gramo, sobre todo cuando está fresco, puesto que los cannabinoides se deterioran al exponerlas a la luz y el calor y al almacenarlas, con pérdida de Δ^9 -THC que en su mayoría se descarboxila hacia cannabinol, que también posee propiedades psicoactivas (Marín Gutiérrez, 2002).

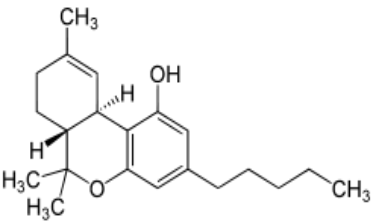
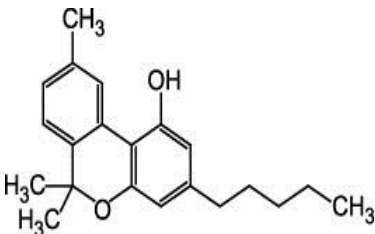
II.VI.III Química de los Cannabinoides.

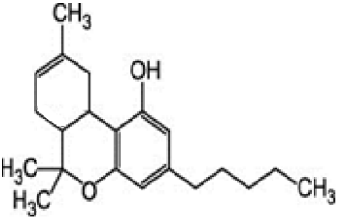
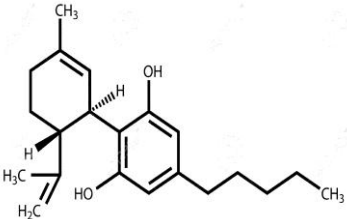
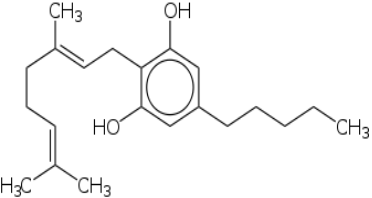
La farmacología del cannabis se empezó a estudiar de una forma sistemática a finales del siglo XIX. En la actualidad se han descrito e identificado más de 400 componentes químicos procedentes de la planta de cannabis, de las cuales se conocen al menos 60 cannabinoides, siendo los más abundantes (Cuadro 3) el Cannabidiol (CBD), el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y el Cannabinol (CNB), estos dos últimos, importantes por sus efectos psicoactivos; también se han identificado otras sustancias, alcaloides y productos aromáticos que nada tendrían que ver con la actividad farmacológica de los cannabinoides (Marín Gutiérrez, 2002)

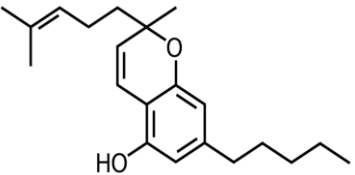
Si bien los efectos del cannabis son debidos fundamentalmente a su contenido cannabinoico, estos contenidos no siempre se presentan en la misma cantidad y proporción, esto debido a sus distintas razones farmacodinámicas y farmacocinéticas. Por lo tanto no existe necesariamente una correspondencia cuantitativa entre los efectos de la preparación y su contenido en Δ^9 -THC (Marín Gutiérrez, 2002).

La variedad índica de la planta *Cannabis sativa* contiene diversas moléculas tricíclicas conocidas como cannabinoides, entre las que destaca por sus efectos psicoactivos el Δ^9 -tetrahidrocannabinol. Los Cannabinoides son un grupo de sustancias que tienen una estructura carbocíclica con 21 carbonos, y están formados generalmente por tres anillos ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno. Estos compuestos son solubles en disolventes orgánicos presentan además

propiedades hidrofóbicas, por lo que son solubles en lípidos. Esto hace que su distribución en el organismo y su eliminación presente diferencias (Arévalo Martín, y otros, 2002).

CANNABINOIDE	CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS	PROPIEDADES FISIQUÍMICAS
<p>Δ^9-tetrahidrocannabinol</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Analgésico ✓ Antiemética ✓ Antiinflamatorio ✓ Euforizante 	<p>Formula empírica: C₂₁H₃₀O₂</p> <p>Peso molecular: 314.46 g/mol.</p> <p>pKa: 10.6</p> <p>Solubilidad</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Agua: insoluble ✓ Etanol: soluble ✓ Cloroformo: soluble ✓ Hexano: soluble <p>Principales picos m/z: 314, 299, 295, 271, 231.</p>
<p>Cannabinol CBN</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Antibiótico ✓ Anticonvulsivo ✓ Antiinflamatorio ✓ Sedante 	<p>Formula empírica: C₂₁H₂₆O₂</p> <p>Peso molecular: 310.43 g/mol.</p> <p>pKa: 10.6</p> <p>Solubilidad</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Agua: insoluble ✓ Etanol: soluble ✓ Cloroformo: soluble ✓ Hexano: soluble <p>Principales picos m/z: 310, 295, 239, 238, 251, 119.</p>

<p>Δ^1-tetrahidrocannabinol</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Antibiótico ✓ Anticonvulsivo ✓ Antiinflamatorio ✓ Sedante 	<p>Formula empírica: $C_{21}H_{30}O_2$</p> <p>Peso molecular: 314.46 g/mol.</p> <p>pKa: 10.6</p> <p>Solubilidad</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Agua: insoluble ✓ Etanol: soluble ✓ Cloroformo: soluble ✓ Hexano: soluble <p>Principales picos m/z: 315, 371, 303, 386, 343.</p>
<p>Cannabidiol CBD</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Analgésico ✓ Antiespasmódico ✓ Antiinflamatorio ✓ Anti-psicótico ✓ Ansiolítico 	<p>Formula empírica: $C_{21}H_{30}O_2$</p> <p>Peso molecular: 314.46 g/mol.</p> <p>Punto de fusión: 66-67 °C</p> <p>Solubilidad</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Agua: insoluble ✓ Etanol: soluble ✓ Cloroformo: soluble ✓ Hexano: soluble <p>Principales picos en m/z: 314, 246, 232, 231, 193, 174, 121.</p>
<p>Cannabigerol CBG</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Analgésico ✓ Antibiótico ✓ Antifúngico ✓ Antiinflamatorio 	<p>Formula empírica: $C_{21}H_{32}O_2$</p> <p>Peso molecular: 316.48 g/mol.</p> <p>Principales picos en m/z: 316, 231, 193, 123, 69.</p>
<p>Cannabicromeno CBC</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Analgésico 	<p>Formula empírica: $C_{21}H_{30}O_2$</p>

	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Antibiótico ✓ Antifúngico Antiinflamatorio 	<p>Peso molecular: 314.46 g/mol.</p> <p>Principales picos en m/z: 231, 174, 91, 69, 55.</p>
---	--	---

Cuadro 3. Principales cannabinoides de relevancia forense presentes en la planta *Cannabis sativa*.

Los cannabinoides interaccionan en el organismo como receptores específicos acoplados a proteínas G, cuyos ligandos endógenos son derivados de ácidos grasos poliinsaturados. Los receptores CB₁ y CB₂ son miembros de una clase de receptores membranales. El receptor CB₁ se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y en menor proporción en el sistema nervioso periférico, aunque también están presentes en ciertos organismo y tejidos periféricos, como glándulas endocrinas, glándulas salivales, leucocitos, bazo, corazón y en determinadas zonas de aparato reproductor, urinario y gastrointestinal; mientras que el receptor CB₂ se distribuye principalmente en las células del sistema inmunológico, entre ellas los leucocitos, el bazo y las amígdalas (Mendoza Patiño , 2008).

En general, la actividad de los receptores cannabinoides da lugar a una inhibición de la adenil-ciclase, lo que impide la conversión del ATP a AMP cíclico (AMPc), sin embargo, sólo la activación de los receptores CB₁ da lugar a los efectos típicos sobre la circulación y la psicosis conocida tras el consumo del cannabis (Mendoza Patiño , 2008).

II.VI.IV Farmacocinética.

Absorción. La cantidad de THC que se absorbe y la velocidad de la absorción dependen de la vía de administración de la droga.

Habitualmente los preparados de *Cannabis sativa* se fuman (vía pulmonar), de esta forma, los principios activos, junto con otros componentes del humo son absorbidos por los pulmones. Cuando se fuman los preparados de cannabis se

pierde parte del THC por pirólisis (descomposición térmica de la materia orgánica en ausencia de oxígeno, generándose cantidades variables de gases, líquidos y residuo carbonoso. Involucrando así cambios simultáneos de composición química y estado físico irreversibles.

Un condensado del humo de la marihuana contiene alrededor de 16% de cannabinoles. Estimándose así que al fumar se absorbe de un 15 a un 50% de Δ^9 -THC.

La entrada del THC a sangre es muy rápida y también lo es su posterior distribución en tejidos, presentan una cinética similar a la obtenida tras su administración intravenosa. La máxima concentración de THC en sangre se alcanza antes de que finalice el consumo del cigarro por lo que el THC se puede detectar en sangre inmediatamente después de la primera calada (1-2 minutos), y las concentraciones máximas se alcanzan entre los 3 y 10 minutos. De una dosis de 2 mg/Kg de THC, aproximadamente el 0.6% alcanza el cerebro. La poca penetración del THC al cerebro se debe a que se une a la albúmina, al pulmón, hígado, riñón, corazón, estómago, bazo, tejido adiposo marrón, placenta, corteza adrenal, tiroides, pituitaria y glándula mamaria. (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2006) (Arévalo Martín, y otros, 2002).

La administración de marihuana por vía oral produce una absorción lenta. Su biodisponibilidad se ve notablemente reducida debido a que las moléculas de THC son susceptibles a la degradación por el jugo gástrico y a la metabolización hepática de primer paso. Así, las concentraciones plasmáticas iniciales del THC suelen tener bajos niveles, provocando un retardo en la aparición de la concentración máxima entre las 2-4 horas posteriores a su administración (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2006) (Arévalo Martín, y otros, 2002)

Distribución. Tras la entrada del THC al organismo, se pueden distinguir diferentes fases de distribución:

1. La primera fase de distribución se caracteriza por una gran perfusión del THC hacia los tejidos, acompañada por un rápido declive de los niveles plasmáticos de este cannabinoide.
2. Una segunda fase de distribución contribuye a la acumulación de THC en los tejidos poco perfundidos.
3. Por último, la siguiente fase se define por una disminución gradual de los niveles del THC en el plasma (Huestis, y otros, 1992)

Cabe destacar que, debido a su naturaleza liposoluble, los cannabinoides tienen la capacidad de atravesar, tanto la barrera hematoencefálica (BHE) como la barrera placentaria, e incluso también, se pueden acumular en la leche materna hasta 8 veces más que en el plasma; en la primera barrera se ejercen acciones en células gliales del SNC, que expresan los receptores CB₁ y CB₂, que a su vez modifican la liberación de citoquinas, que son un importante mediador del daño neuronal en condiciones neuroinflamatorias/neurodegenerativas (Arévalo Martín, y otros, 2002).

Metabolismo. El metabolismo del THC ocurre en el hígado por el sistema microsomal del citocromo P450 (CYP2C) dentro de los primeros minutos en que la marihuana es consumida vía pulmonar. Se han identificado alrededor de 100 metabolitos del THC de entre los cuales, los más relevantes son el 11-nor-9-carboxi-THC (THC-COOH), que es el más abundante pero inactivo, y el 11-hidroxi-THC (11-OH-THC), que presenta una actividad farmacológica semejante a la de su precursor (Moffat, y otros, 2011) (Huestis, y otros, 1992).

Unión a proteínas. Dada la elevada hidrofobicidad de los cannabinoides, estos suelen unirse a diferentes componentes plasmáticos. El 60% de los cannabinoides sistémicos se encuentran unidos a lipoproteínas plasmáticas; otro 9% está acoplado a las células sanguíneas, y el resto a albúmina sérica. Esta propiedad

explica su rápida penetración a los tejidos, sobre todo en aquellos que están altamente vascularizados, y posteriormente pasan al tejido adiposo, donde son depositados tres días después de su ingesta. Tan sólo un 3% del THC presente en la sangre está en su forma libre (Arévalo Martín, y otros, 2002).

Biodisponibilidad. Vía pulmonar 18-50%; después de la ingestión 6-20%.

Tiempo de vida media plasmático. 15-36 hrs., cuando la administración haya sido tras fumar un cigarrillo de marihuana (Moffat, y otros, 2011).

Eliminación. La principal vía de excreción es a través de las heces, que representa al rededor del 65% de la eliminación de los metabolitos del THC. Alrededor del 25% de los metabolitos son excretados en la orina en forma de conjugados con ácido glucurónico durante los 3 días posteriores al consumo de droga. Asimismo estos mismos metabolitos pueden ser excretados en la saliva, el sudor y en el cabello en concentraciones pequeñas pero destacables (Moffat, y otros, 2011) (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2006).

II.VI.V Farmacodinamia. Mecanismo de acción.

Los cannabinoides se unen a receptores localizados en la membrana de algunas células, denominadas CB₁ y CB₂; ambos pertenecen a la extensa familia de receptores acoplados a una proteína G como sistema de transducción (Grotenhermen, 2006). El receptor CB₁ se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y en menor proporción en el sistema nervioso periférico, aunque también están presentes en ciertos órganos y tejidos periféricos, como glándulas endocrinas, glándulas salivales, leucocitos, bazo, corazón y en determinadas zonas del aparato reproductor, urinario y gastrointestinal; mientras que el receptor CB₂ se distribuye principalmente en las células del sistema inmunológico, entre ellas los leucocitos, el bazo y las amígdalas.

En general, la activación de los receptores cannabinoides da lugar a una inhibición de la adenil-ciclase, lo que impide la conversión del ATP a AMP cíclico (AMPc), sin

embargo, sólo la activación de los receptores CB₁ da lugar a los efectos típicos sobre la circulación y la psique conocidos tras el consumo de Cannabis (Grotenhermen, 2006).

El consumo de esta droga ilegal produce efectos sobre la salud a diferentes niveles:

- a) Agudos. Donde el Δ^9 -Tetrahidroxicanabinol incrementa el ritmo cardiaco, la fuerza muscular disminuye, se presenta un incremento de apetito y a su vez se presenta un estado de euforia seguida de una posterior somnolencia.
- b) El sistema inmune se observa deprimido.
- c) El consumo de esta sustancia puede producir pánico, delirio, paranoia; por lo que estos efectos se clasifican como psicopatológicos.

II.VI.VI Análisis toxicológico.

Existen diversos métodos analíticos para demostrar la presencia de cannabinoides; estos se diferencian en su sensibilidad, especificidad, complejidad y costo (UNODC, 2014).

La técnica de screening (presuntiva) predilecta es la técnica inmunoenzimática múltiple (EMIT), mientras que la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) es el método recomendado para la Substance Abuse and Mental Health Service Administration (SAMHSA) para confirmar la presencia de THC, o sus metabolitos en una muestra de origen postmortem (Flanagan, y otros, 2007).

En la práctica, es posible determinar el consumo de cannabis a través del análisis de diversas muestras biológicas, obteniendo de cada una ellas diferente información, sin embargo, la sangre es la muestra de elección general para las

investigaciones, ya que es el fluido que se encarga de distribuir las sustancias por todo el organismo (García Rodríguez, y otros, 2005).

No obstante, lo anterior no quiere decir que la sangre sea la muestra idónea, ya que muchos tóxicos, incluido el THC desaparecen pronto de ella debido a sus características farmacocinéticas, por tal motivo, es difícil determinar la responsabilidad legal atribuible a los efectos del cannabis, porque a diferencia de otras drogas, no existe una buena correlación entre las concentraciones plasmáticas y los efectos psicoactivos (UNODC, 2014).

En este contexto, el laboratorio forense juega un papel muy importante en el análisis toxicológico de muestras postmortem para la detección de los principales metabolitos de la marihuana, ya que por su condición de modificadores de la conducta, capacidad de percepción, estado de alerta, y otras actuaciones del individuo, pueden tener consecuencias legales para el individuo (Palencia, y otros, 2008).

Dentro de este esquema, la interpretación de los niveles de metabolitos de la marihuana en sujetos de autopsia permiten extrapolar los valores correspondientes al momento en que se recogieron las muestras, hasta el momento del accidente o del incidente pudiéndose así establecer una hipótesis sobre la concentración de la droga en sangre en el momento que ingresa el cuerpo y como consecuencia, el posible grado de afectación del individuo en el momento del incidente (Palencia, y otros, 2008). De la validez de esta prueba y sus resultados dependerá el dictamen final de las autoridades para sentar las responsabilidades del caso.

Es así como el constante interés en el análisis y determinación de los productos cannabinicos en sangre de consumidores ha conducido a realizar un esfuerzo para aplicar a este problema las más modernas técnicas instrumentales de análisis químico disponible (Rodríguez Carranza, 2012), e incluso eficientizar las ya existentes.

III. OBJETIVOS

III.I OBJETIVO GENERAL.

Mediante la aplicación de la técnica de extracción en fase sólida obtener productos cannabicos provenientes de muestras de sangre postmortem que serán identificados mediante la GC/MS.

III.II OBJETIVOS PARTICULARES

- Emplear la técnica inmunoenzimática múltiple (EMIT) para una detección preliminar de productos cannabicos presentes en muestras de sangre postmortem.
- Efectuar la extracción en fase sólida (EFS) a las muestras de sangre de origen postmortem que proporcionaron un resultado confirmativo a la presencia de productos cannabicos en el análisis preliminar, para poder así aislar de la matriz los cannabinoides presentes.
- Identificar y confirmar la presencia de los cannabinoides extraídos, mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

IV. HIPÓTESIS.

La extracción en fase sólida (EFS) podría permitir el aislamiento de productos cannabinoides presentes en muestras de sangre postmortem, para posteriormente hacer uso de la GC/MS como herramienta para la identificación y posterior validación de la presencia de los mismos cannabinoides; considerando a esta como una técnica de extracción útil para el análisis toxicológico de futuros requerimientos judiciales que así lo precisen.

V. METODOLOGÍA.

V.I MATERIAL

- Pipetas graduadas Kimax® de 5 y 10 mL.
- Micropipeta Science Med® con capacidad de 10-100 µL.
- Tubos para centrifuga.
- Cartuchos para extracción en fase sólida Varian® Bond Elut Certify
- Matraces volumétricos Kimax® de 10, 25, 100 y 250 mL

V.II EQUIPO

- Cromatógrafo de gases. Agilent Technologies® 6890N Network GC System Detector de Masas (Cuadripolo) Agilent 5973 MSD Columna capilar disponible modelo 19091S-433 HP-5MS (30.0 m x 250 µm x 0.25 µm) con un recubrimiento de fenil metil siloxano 5%.
- Centrifuga Aparatos Científicos Solbat®
- Bomba de vacío EASY/VAG® con válvulas.
- Vortex 3 000 rpm Labnet® vx100 Touch
- Baño calefactor para tubos de ensaye LAB-LINE ®
- Dispensador de Nitrógeno
- Estufa UltraClean®

V.III REACTIVOS

- Ácido tricloroacético Cristal, J.T Baker®, Grado Analítico
- Ácido clorhídrico, Golden Bell®, Grado Analítico
- Metanol, J.T Baker®, Grado Analítico
- Fosfato de potasio monobásico, Merck®, Grado Analítico
- Fosfato de sodio, Reproquifin®, Grado Analítico
- Ácido acético glacial, Merck®, Grado Analítico
- Hexano, Reproquifin®, Reactivo Analítico
- Acetato de etilo, J.T Baker®, Grado Analítico
- Derivatizante BSTFA+TMCS (99:1) de SUPELCO®
- Kit de enzimas SIEMENS

V.IV PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Ácido tricloroacético al 20%
Pesar 50 g de Ácido tricloroacético (TAA), colocar en un matraz aforado de 250 mL y aforar con agua destilada.
- Ácido clorhídrico
Colocar 2.5 mL de Ácido clorhídrico concentrado (HCl) en un matraz aforado de 25 mL y aforar con agua destilada.
- Buffer fosfatos pH 6
 - Solución A 1/15 M de Fosfato de hidrógeno disódico (Na_2HPO_4): colocar 0.947 g de Na_2HPO_4 en un matraz aforado de 100 mL y aforar con agua destilada.
 - Solución B 1/15 M de Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4): colocar 0.908 g de KH_2PO_4 en un matraz aforado de 100 mL y aforar con agua destilada.

En un matraz volumétrico de 100 mL adicionar una alícuota de 7.2 mL de solución A, agregar 5.0 mL solución B y aforar con agua destilada (verificar pH 6).

- Ácido acético 1M
Colocar 14.3 mL de Ácido acético (CH_3COOH) en un matraz aforado de 250 mL y aforar con agua destilada.

V.V MUESTRA BIOLÓGICA

- Sangre postmortem de cadáveres humanos procedentes del anfiteatro del INCIFO, los cuales poseen una averiguación previa.

V.VI METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA E IDENTIFICACIÓN DE CANNABINOIDES.

SISTEMA ANALÍTICO TOXICOLÓGICO (Diagrama 3)



Diagrama 3 Sistema Analítico Toxicológico aplicado en el estudio.

MUESTRA BIOLÓGICA: Sangre postmortem de cadáveres humanos procedentes del anfiteatro del Instituto de Ciencias Forenses, a la cual los médicos legistas solicitan un análisis tóxicológico.

PRETRATAMIENTO: *Desproteinización* (eliminación de proteínas) la cual se realiza mediante extracciones repetidas de las proteínas con disolventes orgánicos (en este caso con metanol y ácido tricloroacético).

ANÁLISIS PRESUNTIVO. Técnica Inmunoenzimática Múltiple (EMIT®II)

El examen preliminar se realizó en un analizador V-Twin[®] marca Siemens[®], equipado con una lámpara de yodo-cuarzo que utiliza una longitud de onda entre 340 y 770 nm.



Ilustración 3. Equipo V-Twin.

Calibración del equipo. La calibración del equipo se llevó a cabo una vez por semana; para este propósito se emplearon calibradores y controles para los cinco grupos de drogas de abuso más comúnmente detectadas en el laboratorio de toxicología forense (anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepinas, cannabinoides, metabolitos de cocaína y opiáceos). La absorbancia obtenida por la lámpara de yodo-cuarzo del equipo a la longitud de onda ya señalada será considerada como el “límite de corte” o el mínimo detectable de la droga de abuso.

Desproteinización. En un tubo para centrífuga se colocaron 2 mL de metanol y 1 mL de sangre. La mezcla se homogeneizó en un vortex durante 120 segundos, y posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 3500 rpm.

Técnica Inmunoenzimática Múltiple (EMIT). Se tomó un alícuota de 1 mL del sobrenadante obtenido en el pretratamiento, y se depositó en una celdilla; ésta a su vez se colocó en el equipo, el cual realizó el análisis de forma automatizada.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. Métodos de extracción en fase sólida.

El procedimiento de operación para definir una técnica específica de extracción de cannabinoides fue el siguiente:

1. Recepción de muestras.

2. Cotejado con cadena de custodia y registro en bitácora de registro de muestras.
3. Preparación de las muestras para análisis presuntivo de drogas de abuso (*desproteínezación* de la muestra anteriormente citada).
4. Identificación de las muestras positivas para cannabinoides mediante el análisis preliminar de la *Técnica Inmunoenzimática Múltiple*.
5. Diseño y aplicación de las diferentes técnicas de extracción a las muestras de sangre postmortem con presencia de cannabinoles.
6. Elección y aplicación de técnica específica para la extracción de cannabinoides presentes en muestras de sangre de origen postmortem.

A continuación se detallan las técnicas ensayadas.

i. Técnica de extracción en fase sólida.

Desproteínezación. Se tomó una alícuota de 2mL de muestra de sangre y se depositó en un tubo de plástico con tapa de rosca, al cual se le adicionaron previamente 4mL de una solución de ácido tricloroacético al 20%. La mezcla se homogeneizó en un vortex por 30 segundos y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos.

Extracción en fase sólida. Se empleó un cartucho de extracción en fase sólida (EFS) Bond Elut®Varian® con fase estacionaria C₁₈. La fase estacionaria del cartucho de extracción fue activada con 2 mL de metanol y 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos a pH=6, y posteriormente se hizo pasar a través del cartucho al sobrenadante obtenido en el paso de desproteínezación.

Se eluyeron los otros componentes que no son de interés adicionando al cartucho 0.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6, enseguida se adicionó 1 mL de una mezcla de solución de amortiguadora de fosfato pH6 y metanol en una proporción 8:2 y 1mL de ácido acético 1M. El cartucho se dejó reposar por 2 minutos, y después se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos.

La elución del THC presente en la muestra se efectuó añadiendo 1mL de una mezcla de hexano- acetato de etilo (80:20) al cartucho.

Todo el procedimiento se trabajó a una velocidad de flujo constante.

El producto obtenido se recolectó en un vial, y se concentró bajo corriente de nitrógeno hasta sequedad.

ii. Técnica de extracción en fase sólida con el uso de derivatizante.

- a. *Desproteínización.* Se tomó una alícuota de 2mL de muestra de sangre y se depositó en un tubo de plástico con tapa de rosca, al cual se le adicionaron previamente 4mL de una solución de ácido tricloroacético al 20%. La mezcla se homogeneizó en un vortex por 30 segundos y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos.
- b. *Hidrólisis ácida.* El sobrenadante obtenido en la desproteínización se colocó en un segundo tubo, se le adicionó 1 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 10%, y esta mezcla se dejó reposar durante 10 minutos para permitir que la reacción de hidrólisis se llevara a cabo.
- c. *Extracción en fase sólida.* Se empleó un cartucho de extracción en fase sólida (EFS) Bond Elut Certify Varian® con fase estacionaria C₁₈. En donde la muestra antes hidrolizada (como se indicó en el inciso b) fue adicionada sobre la parte superior del cartucho de EFS, el cual fue previamente activado con 2 mL de metanol y 2mL de solución buffer de fosfato pH 6. (*activación de la columna*).
- d. *Lavado de columna.* El cartucho se lavó haciendo pasar a través de el 0.5 mL de solución amortiguadora de fosfato pH=6, se adicionó 1mL de una

mezcla de solución amortiguadora de fosfato pH=6 y metanol (8:2) y 1 mL de ácido acético 1M.

- e. El cartucho se dejó reposar por dos minutos, y después se centrifugó durante 15 minutos a 3500 rpm.
- f. La *elución* del THC presente en la muestra se realizó añadiendo al cartucho 1mL de una mezcla de hexano y acetato de etilo en una proporción 8:2.

En todos los pasos de la extracción se trabajó a una velocidad de flujo constante.

El producto obtenido fue depositado en un vial para ser concentrado bajo corriente de nitrógeno y a una temperatura de 40 °C, proporcionada por una parrilla de calentamiento hasta sequedad.

- g. *Derivatización*. Se adicionó al vial 50 µL de BSTFA+TMCS (99:1) de SUPELCO®, en presencia de un flujo de nitrógeno, se agitó, y se incubó a 70 °C por 20 minutos en la estufa.
- h. Una vez transcurrido el tiempo antes señalado se dejó templar la muestra durante 10 minutos para su posterior inyección en el Cromatógrafo.

ANÁLISIS CONFIRMATIVO.

Cromatografía de gases/ Espectrometría de Masas (GC/MC).

Las pruebas confirmativas se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases marca Agilent®, modelo 6890N acoplado a un detector de espectrometría de masas marca Agilent®, modelo 5973N y una columna capilar de la misma marca modelo 19091S-433 HP-5MS (30.0 m x 250 µm x 0.25 µm) con un recubrimiento de fenil

metil siloxano 5%. Como gas portador se utilizó el Helio, con una velocidad de flujo de 31.7 mL/min y una presión de 8.23 psi.

Temperaturas de trabajo:

Temperatura del inyector (modo split): 220° C.

Programa de temperatura (rampeo): temperatura inicial de 60° C, manteniéndose esta temperatura durante 1 minuto; después se incrementó a una velocidad de 30°C/min hasta llegar a 290° C, esta temperatura se mantuvo durante 6 minutos.

Tiempo total: 15.67 minutos.

Se inyectaron al GC/MS 2µL de cada producto obtenido.

Software. Se empleó un programa Enhanced Data Analysis para la identificación de los compuestos obtenidos en los cromatogramas, este programa usa como una base de comparación la biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology).

VI. RESULTADOS.


ANÁLISIS PRESUNTIVO. Técnica Inmunoenzimática Múltiple (EMIT[®] II)

El análisis presuntivo con la Técnica Inmunoenzimática Múltiple (EMIT[®] II) fue realizado a un total de 536 muestras postmortem recibidas en el Laboratorio de Química del Instituto de Ciencias Forenses en el periodo comprendido de Febrero a Agosto de 2015; de las cuales se descartaron aquellas que no fueran muestras sanguíneas (hígado, humor vítreo, contenido gástrico u orina), a su vez fueron ignoradas las muestras de sangre que estuvieran en mal estado (coaguladas o putrefactas) y que su concentración de THC en el análisis presuntivo con el EMIT arrojaran resultados por debajo de 51.5 ng/mL.

- Selección de las muestras.

Del total de muestras analizadas por la técnica de EMIT, 34 de ellas arrojaron un resultado positivo (valor de absorbancia superior al límite de corte) en la detección preliminar de THC, de las cuales solo 11 de ellas, se trataban de una matriz biológica de sangre; estas fueron tomadas en cuenta para el posterior ensayo de los métodos de extracción. De entre esta población se eligieron solamente 3 como muestras control, cuya absorbancia resultó ser considerablemente mayor al límite de detección establecido por el kit de enzimas SIEMENS de cannabinoides (>50.0 ng/mL). A continuación en el Cuadro 4, se mencionan aquellas muestras que cumplieron con los valores señalados, donde el *valor de corte* es aquella cantidad mínima detectable de THC después de realizada la calibración del equipo y *valor medido* se refiere a la cantidad real detectada de THC por la lámpara de yodo-cuarzo que posee el equipo.

	No. expediente	Edad	Sexo	Valor corte (nm)	Valor medido (nm)	Resultado ng/mL
1	728	31	M	0.303	0.331	54.6
2	831	18	F	0.292	0.315	53.9
3	920	30-35	M	0.301	0.327	54.3
4	2116	45	M	0.326	0.338	51.8
5	2118	46	F	0.326	0.337	51.7
6	2125	42	M	0.326	0.337	51.7
7	2506	40	M	0.305	0.324	53.1
8	2857	30	M	0.357	0.428	59.9
9	2869	29	M	0.357	0.402	56.3
10	2908	22	M	0.357	0.420	58.8
11	3198	30	M	0.321	0.366	57.0

Cuadro 4. Muestras de sangre con resultados positivos en la detección de THC con EMIT. Las columnas coloreadas  se consideran como las muestras control para análisis en el CG/MS.

Los resultados presentados con anterioridad se obtuvieron mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$\frac{(Valor\ medido\ [nm])(Concentración\ de\ THC\ [50\ ng/mL])}{Valor\ de\ corte[nm]}$$

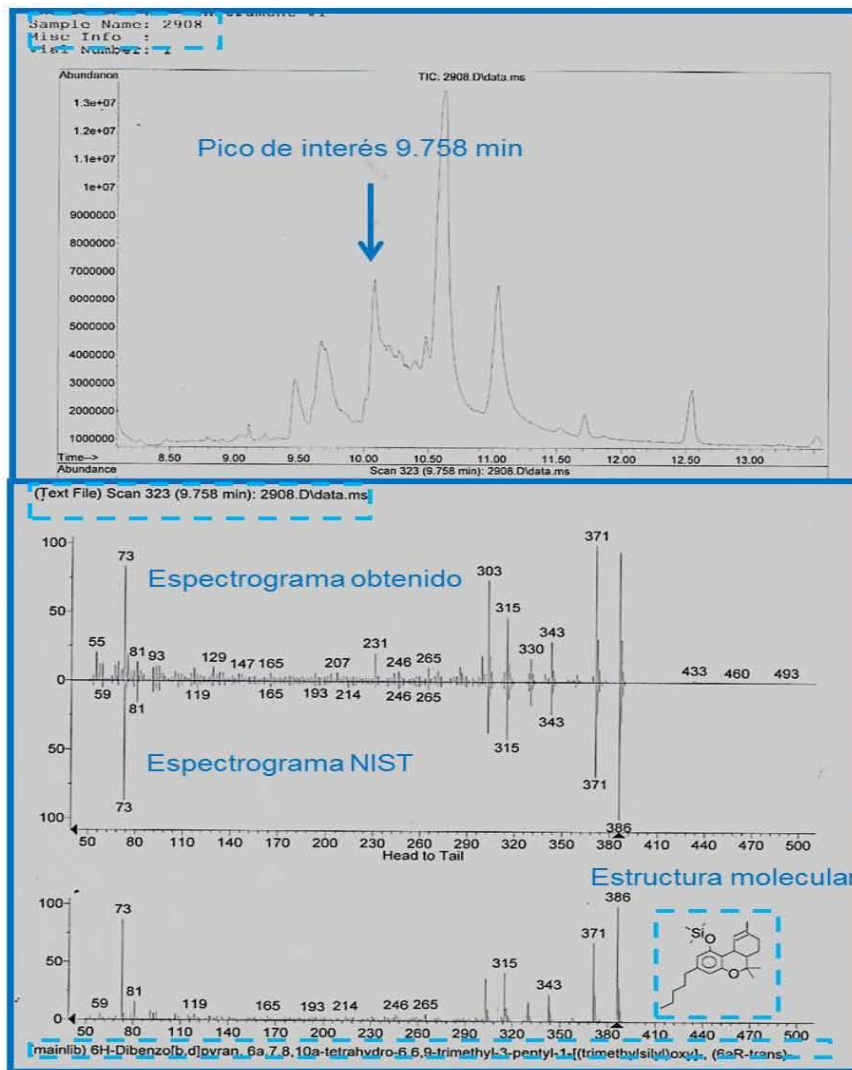
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. Métodos de extracción.

Se procedió a realizar la extracción de THC, probando las dos técnicas antes mencionadas (i y ii) para las muestras control (2857, 2908 y 3198). Obteniendo el aislamiento de los productos cannabinoides de la matriz biológica sólo con la segunda técnica.

ANÁLISIS CONFIRMATIVO. Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas (GC/MS).

Los 3 productos obtenidos se analizaron mediante la técnica de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/MS). De los cuales fue posible evidenciar picos correspondientes a diferentes cannabinoides.

A continuación se muestran los espectros obtenidos, sus patrones de fragmentación, una comparación de estos con la biblioteca NIST, la probabilidad de identificación del cannabinoide, mismo dato que es predicho por la biblioteca usada, su fórmula condensada, así como el nombre del cannabinoide y sus sinónimos.

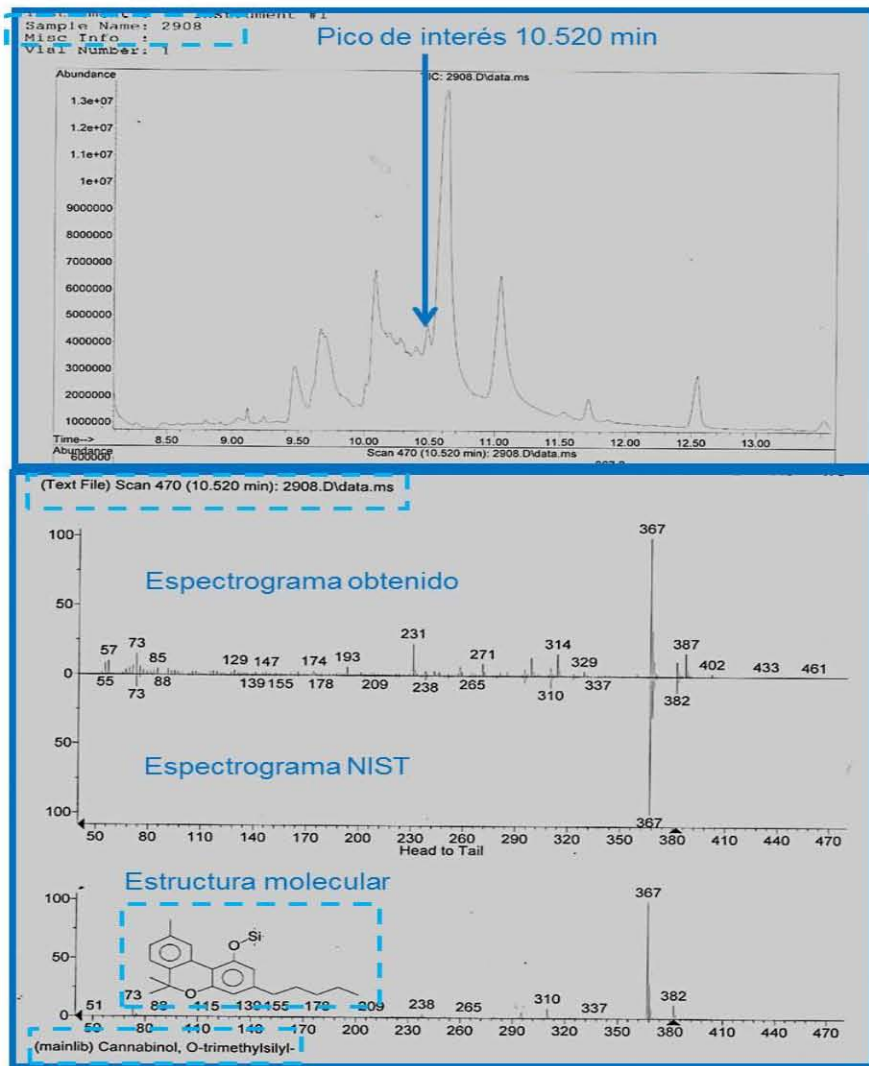


Library Searched : C:\Database\NIST05.L
Quality : 99 ← Probabilidad (%)
ID : 6H-Dibenzo[b,d]pyran, 6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-1-[(trimethylsilyl)oxy]-, (6aR-trans)-

Name: 6H-Dibenzo[b,d]pyran, 6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-1-[(trimethylsilyl)oxy]-, (6aR-trans)-
Formula: C₂₄H₃₈O₂Si
MW: 386 CAS#: 55449-68-8 NIST#: 79648 ID#: 159778 DB: mainlib
Other DBs: None
Contributor: O A MAMER, MCGILL UNIVERSITY, MONTREJ
10 largest peaks:
386 999 | 73 870 | 371 686 | 315 421 | 303 369 | 387 294 | 343 236 | 372 232 | 43 178 | 330 167 |
Synonyms:
1..DELTA.-1-Tetrahydrocannabinol
2,6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-yl trimethylsilyl ether #

Cannabinoide obtenido y fórmula condensada

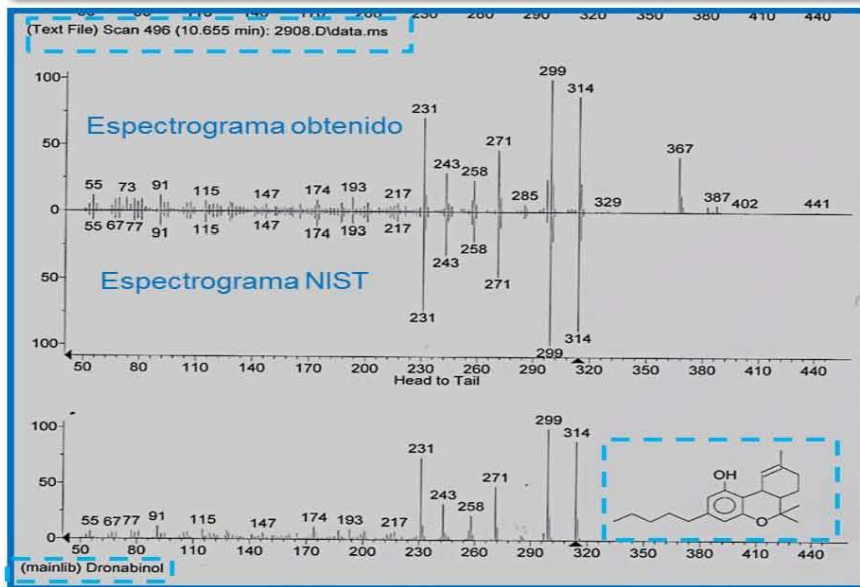
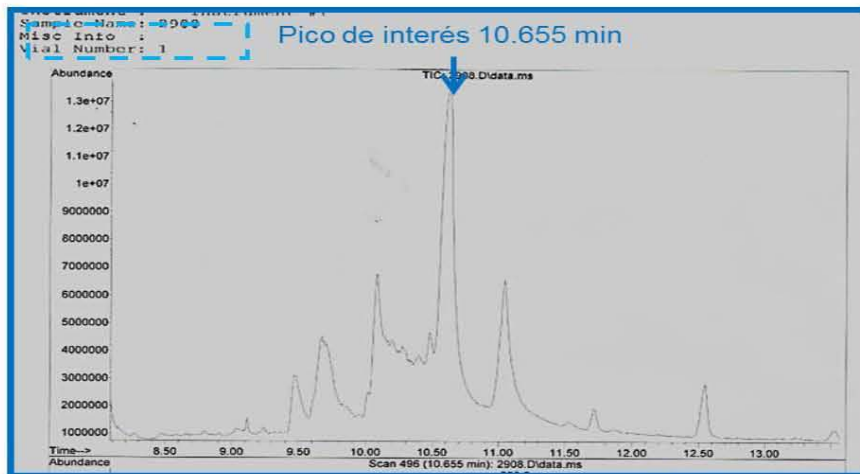
Ilustración 4. Muestra número 2908 con presencia de Δ^1 -tetrahydrocannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.



Library Searched : C:\Database\NIST05.L
Quality : 97 ← Probabilidad (%)
ID : Cannabinol, O-trimethylsilyl-

Name: Cannabinol, O-trimethylsilyl- ← Cannabinoide obtenido y fórmula condensada
Formula: C₂₄H₃₄O₂Si
MW: 382 CAS#: 64848-18-0 NIST#: 152903 ID#: 158628 DB: mainlib
Other DBs: None
Contributor: Chemical Concepts
10 largest peaks:
367 999 | 368 297 | 382 116 | 73 91 | 369 85 | 310 84 | 295 49 | 383 36 | 238 31 | 311 24 |
Synonyms:
1,6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6H-benzo[c]chromen-1-yl trimethylsilyl ether #

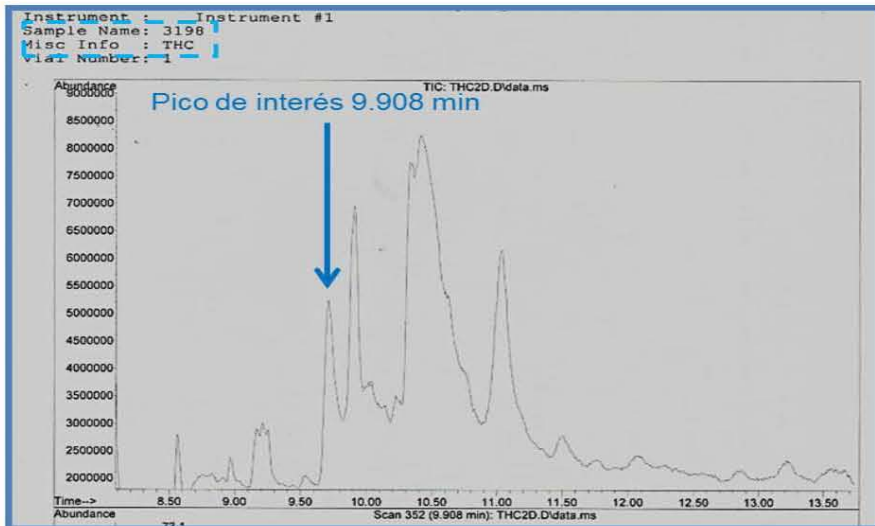
Ilustración 5. Muestra número 2908 con presencia de Cannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.



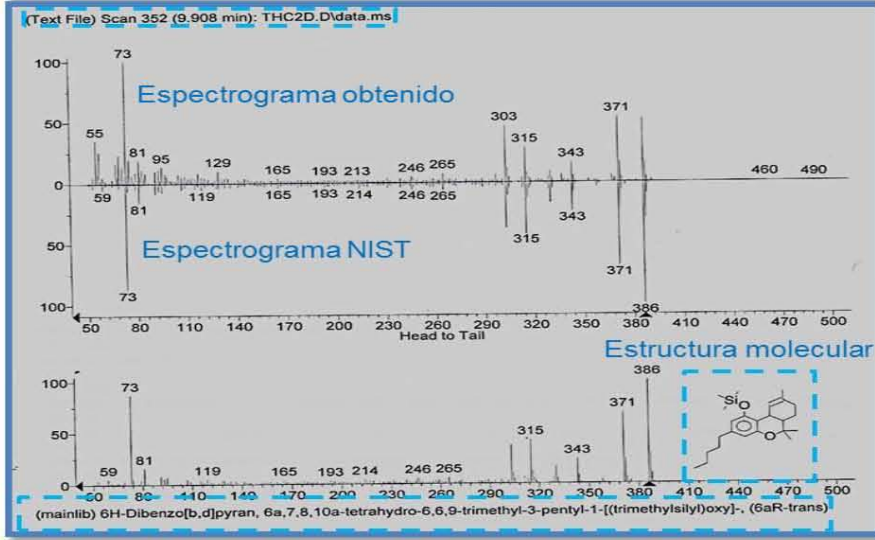
Library Searched : C:\Database\NIST05.L
 Quality : 99 ← Probabilidad (%)
 ID : Dronabinol

Name: Dronabinol
 Formula: C₂₁H₃₀O₂ ← Cannabinoide obtenido y fórmula condensada
 MW: 314 CAS#: 4072-88-3 NIST#: 246874 ID#: 28841 DB: replib
 Other DBs: RTECS, USP, NIH
 Contributor: AAFS Toxicology Section MS DB Committee, U. Alberta, Canada
 10 largest peaks:
 299 999 | 314 800 | 231 726 | 271 471 | 243 341 | 258 267 | 300 219 | 91 201 | 315 174 | 115 139 |
 Synonyms:
 1. DELTA-9-Tetrahydrocannabinol
 2. 6H-Dibenzo[b,d]pyran-1-ol, 6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-, (6aR-trans)-
 3. delta.1-Tetrahydrocannabinol
 4. delta.1-THC
 5. delta.9-trans-Tetrahydrocannabinol
 6. (-)-delta.1-Tetrahydrocannabinol
 7. (-)-delta.9-trans-Tetrahydrocannabinol
 8. (-)-delta.9-Tetrahydrocannabinol
 9. (-)-delta.9-THC
 10. (-)-trans-delta.9-Tetrahydrocannabinol
 11. (l)-delta.1-Tetrahydrocannabinol
 12. L-delta.1-trans-Tetrahydrocannabinol
 13. L-trans-delta.9-Tetrahydrocannabinol
 14. trans-delta.9-Tetrahydrocannabinol
 15. Abbott 40566
 16. Cannabinol, .delta.1-Tetrahydro-
 17. SP 104
 18. Tetrahydrocannabinol
 19. 14C-delta.1-Tetrahydrocannabinol
 20. delta.(sup9)-Thc
 21. (-)-delta.(sup9)-trans-Tetrahydrocannabinol
 22. Cannabinol, 1-trans-.delta.(sup9)-tetrahydro-
 23. QCD 84924
 24. 1-trans-.delta.(sup9)-tetrahydrocannabinol
 25. 6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-7,8,9,10-tetrahydro-6H-dibenzo(b,d)pyran-1-ol
 26. 6H-Dibenzo(b,d)pyran-1-ol, 6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-
 27. 6H-Dibenzo(b,d)pyran-1-ol, 6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-, trans-
 28. (6aR,10aR)-6a,7,8,10a-Tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol
 29. Marinol
 30. Primolut
 31. (-)-trans-DELTA.1-Tetrahydrocannabinol
 32. (-)-trans-delta.9-Thc
 33. Exocyclic .delta.(9)(11)-Tetrahydrocannabinol
 34. 6H-Dibenzo(b,d)pyran-1-ol, 6a,7,8,10a-tetrahydro-6,9,9-trimethyl-3-pentyl-, (6aR-trans)-
 35. NSC-134454
 36. 6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol #
 37. .delta. 9-Thc
 38. Delta 9-thc
 39. .delta.9-Thc

Ilustración 6. Muestra número 2908 con presencia de Δ^9 -tetrahydrocannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.

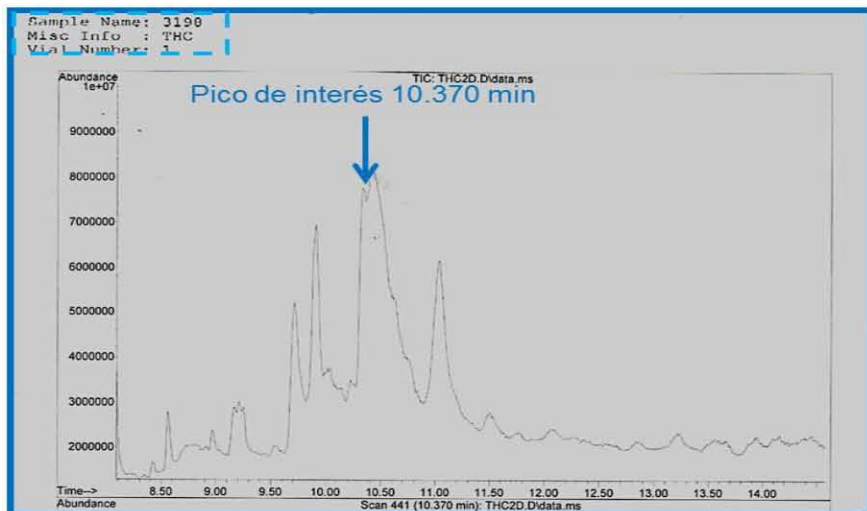


Library Searched : C:\Database\NIST05.L
 Quality : 99 **Probabilidad (%)**
 ID : 6H-Dibenzo[b,d]pyran, 6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-1-[(trimethylsilyl)oxy]-, (6aR-trans)-ethyl-3-pentyl-1-[(trimethylsilyl)oxy]-, (6aR-trans)-



Name: 6H-Dibenzo[b,d]pyran, 6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-1-[(trimethylsilyl)oxy]-, (6aR-trans)-
 Formula: C₂₄H₃₈O₂Si
 MW: 386 CAS#: 55449-68-8 NIST#: 79848 ID#: 159778 DB: mainlib
 Other DBs: None
 Contributor: O A MAMER, MCGILL UNIVERSITY, MONTREAL
 Cannabinoide obtenido y fórmula condensada
 10 largest peaks:
 386 999 | 73 870 | 371 688 | 315 421 | 303 369 | 387 294 | 343 236 | 372 232 | 43 178 | 330 167 |
 Synonyms:
 1..DELTA-1-Tetrahydrocannabinol
 2,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-yl trimethylsilyl ether #
 Estimated Kovats RI:
 Value: 2552 iu
 Confidence interval (Diverse functional groups): 89(50%) 382(95%) iu

Ilustración 7. Muestra número 3198 con presencia de Δ^1 -tetrahydrocannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.



Library Searched : C:\Database\NIST05.L
Quality : 98 ← Probabilidad (%)
ID : Cannabinol, O-trimethylsilyl-

Name: Cannabinol, O-trimethylsilyl- ← Cannabinoide obtenido y fórmula condensada
Formula: C₂₄H₃₄O₂Si
MW: 382 CAS#: 64846-18-0 NIST#: 152983 ID#: 158628 DB: mainlib
Other DBs: None
Contributor: Chemical Concepts
10 largest peaks:
367.999 | 368.297 | 382.116 | 73.91 | 369.85 | 310.84 | 295.49 | 383.36 | 238.31 | 311.24 |
Synonyms:
1,6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6H-benzo[c]chromen-1-yl trimethylsilyl ether #

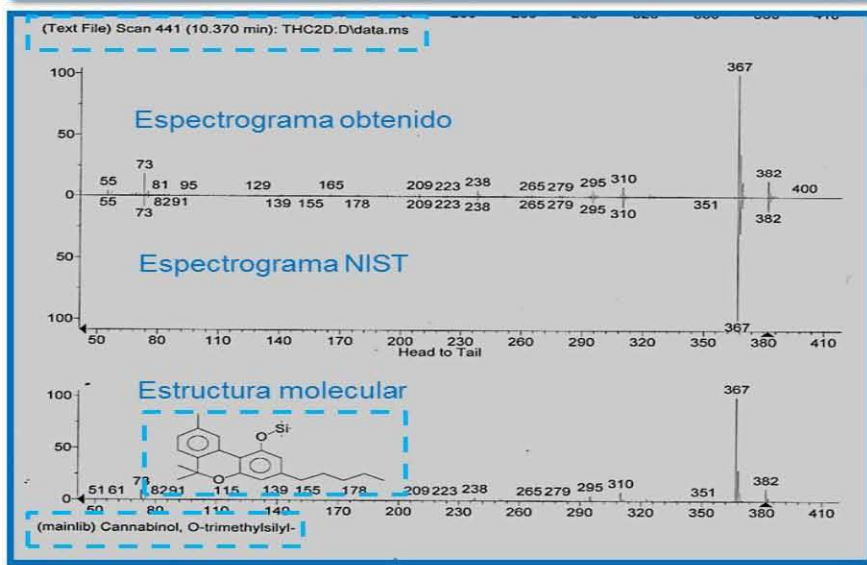


Ilustración 8. Muestra número 3198 con presencia de Cannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.

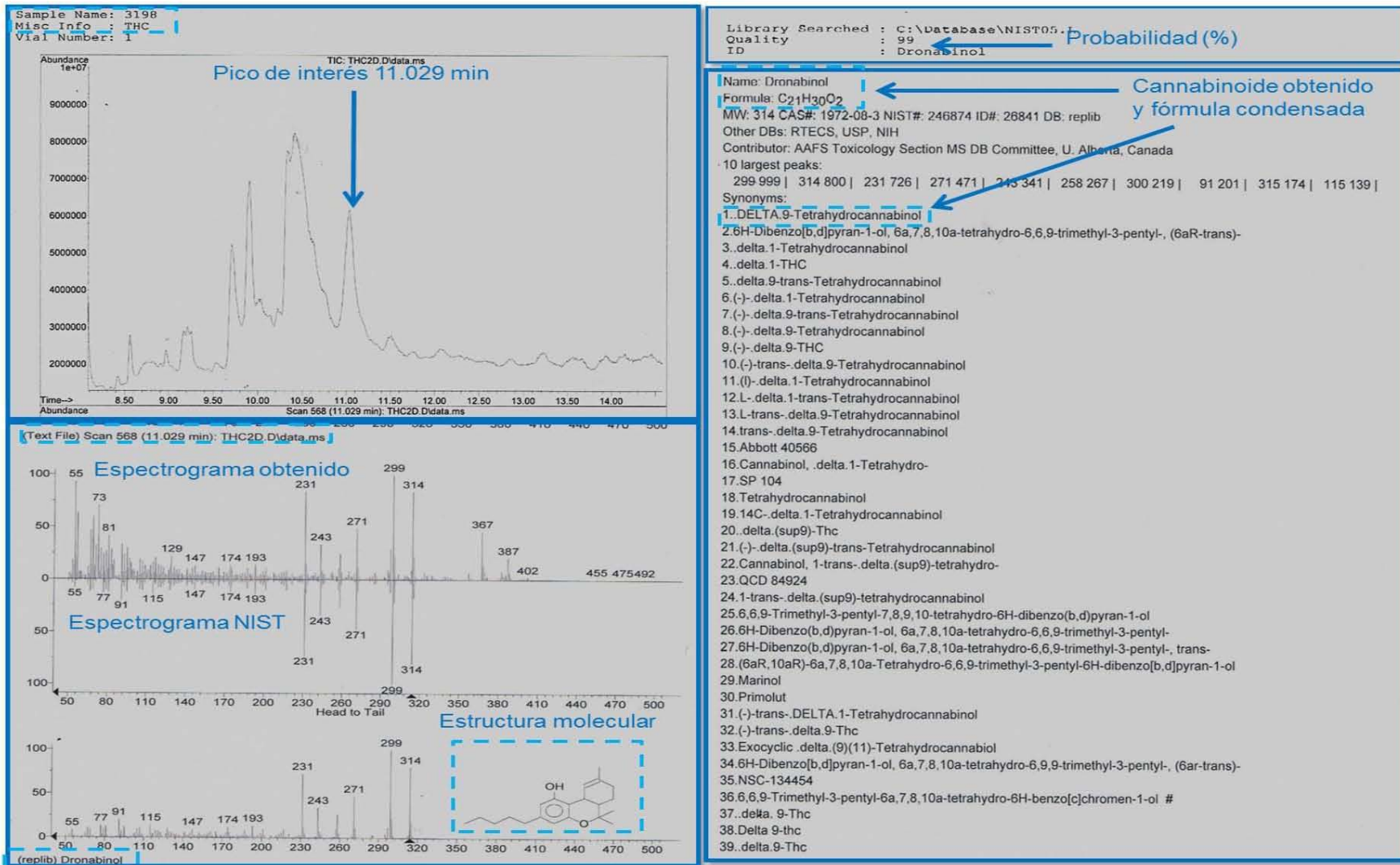
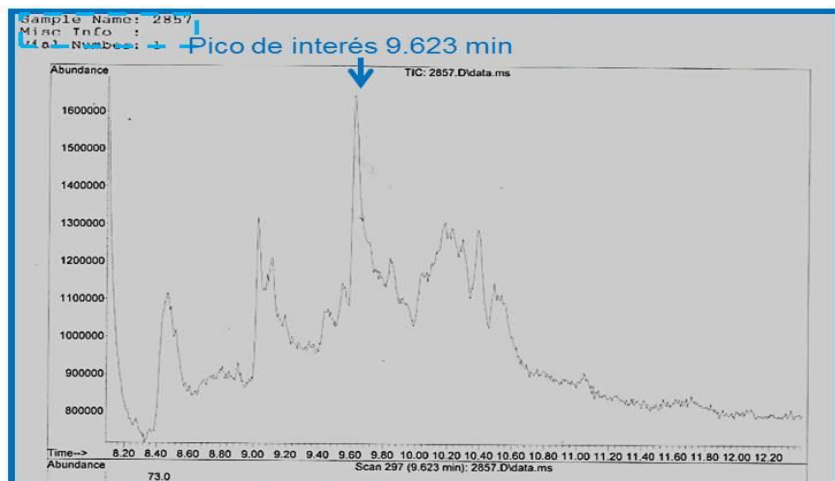


Ilustración 9. Muestra número 3198 con presencia de Δ^9 -tetrahydrocannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.



Library Searched : C:\Database\NIST05.L
 Quality : 99 ← Probabilidad (%)
 ID : 6H-Dibenzo[b,d]pyran, 6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-1-[(trimethylsilyl)oxy]-, (6aR-trans)-

Name: 6H-Dibenzo[b,d]pyran, 6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl 1 [(trimethylsilyl)oxy]-, (6aR-trans)-
 Formula: C₂₄H₃₈O₂Si
 MW: 386 CAS#: 55449-68-8 NIST#: 79848 ID#: 159778 DB: mainlib
 Other DBs: None
 Contributor: O A MAMER, MCGILL UNIVERSITY, MONTREJ
 10 largest peaks:
 386.999 | 73.870 | 371.686 | 315.421 | 303.369 | 387.294 | 343.236 | 372.232 | 43.178 | 330.167 |
 Synonyms:
 1-DELTA-1-Tetrahydrocannabinol
 2,6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-yl trimethylsilyl ether #

Cannabinoide obtenido y fórmula condensada

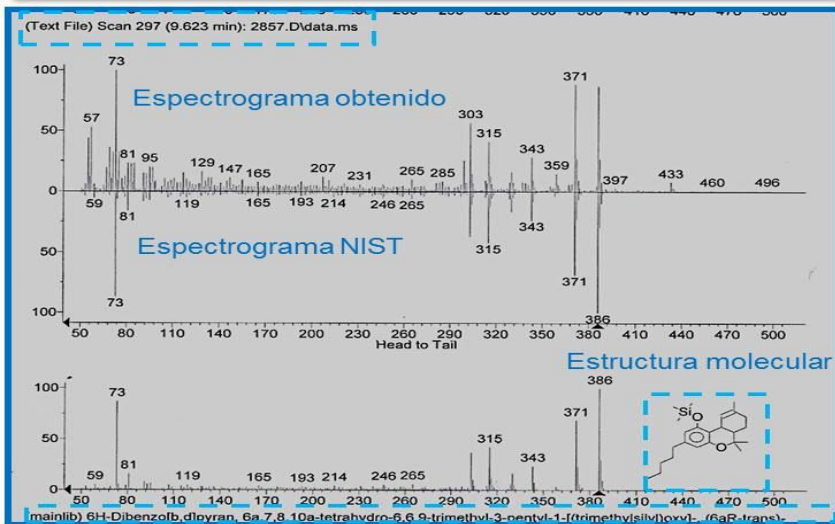
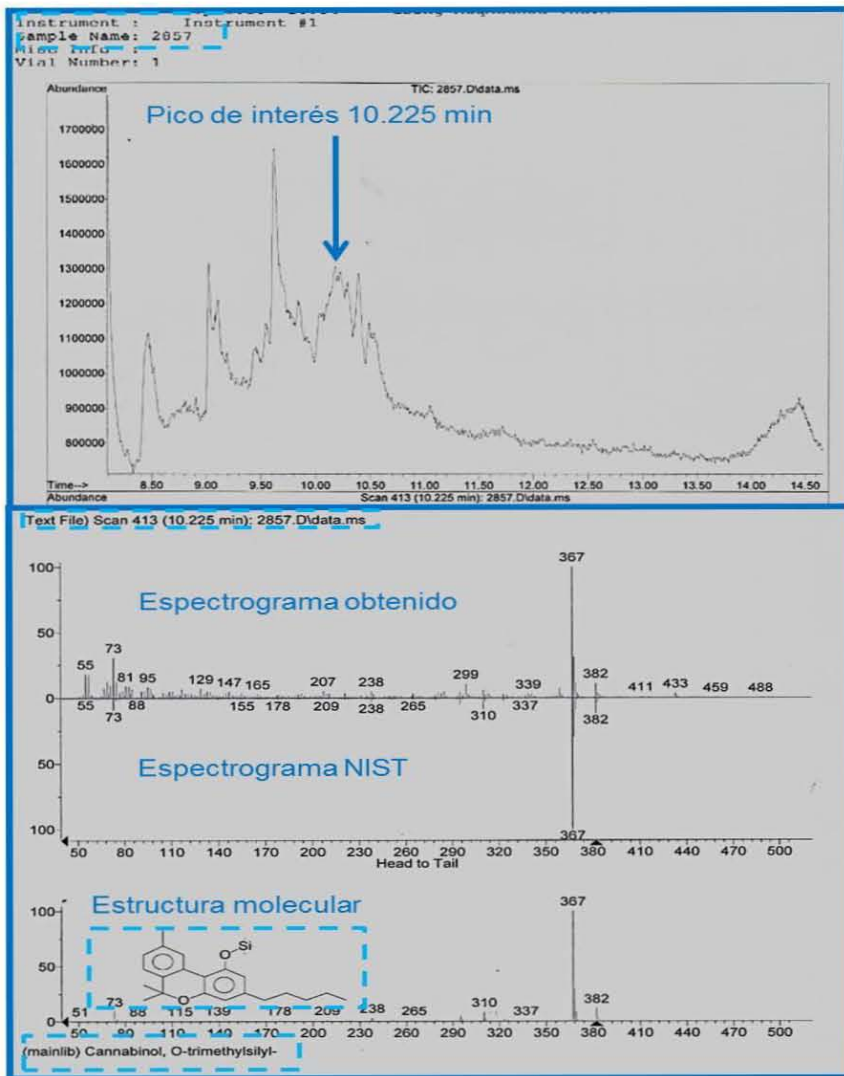


Ilustración 10. Muestra número 2857 con presencia de Δ^1 -tetrahydrocannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.



Library Searched : C:\Database\NIST05.L
 Quality : 95 ← Probabilidad (%)
 ID : Cannabinol, O-trimethylsilyl-

Name: Cannabinol, O-trimethylsilyl- ← Cannabinoide obtenido y fórmula condensada
 Fórmula: C₂₄H₃₄O₂Si
 MW: 382 CAS#: 64846-18-0 NIST#: 152983 ID#: 158628 DB: mainlib
 Other DBs: None
 Contributor: Chemical Concepts
 10 largest peaks:
 367.999 | 368.297 | 382.116 | 73.91 | 369.85 | 310.84 | 295.49 | 383.36 | 238.31 | 311.24 |
 Synonyms:
 1,6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6H-benzo[c]chromen-1-yl trimethylsilyl ether #

Ilustración 11. Muestra número 2857 con presencia de Cannabinol, se muestra espectrograma, patrones de fragmentación, estructura molecular, probabilidad de identificación del cannabinoide, fórmula condensada, así como sinónimo(s) del mismo.

Los cannabinoides detectados en las 3 muestras analizadas, así como sus tiempos de retención se enlistan en el Cuadro 5:

MUESTRAS CONTROL			
Extracción en fase sólida			
No. de muestra	Cannabinoide	Tiempo de retención (min)	Probabilidad (%)
2908	Δ^1 -THC	9.758	99
	Cannabinol	10.520	97
	Δ^9 - THC	10.655	99
3198	Δ^1 -THC	9.908	99
	Cannabinol	10.370	98
	Δ^9 - THC	11.029	99
2857	Δ^1 -THC	9.623	99
	Cannabinol	10.225	95

Cuadro 5. Cannabinoides detectados en los productos de las muestras control obtenidos mediante la técnica de extracción en fase sólida con derivatizante (ii) y sus respectivos tiempos de retención.

Como podemos observar en el cuadro anterior cada uno de los componentes de la muestra problema, presentó un tiempo característico de paso por el sistema (**tiempo de retención**), la velocidad de migración de cada componente fue en función de su distribución entre las fases, por lo tanto, una vez separados, detectados, e incluso una vez dada la probabilidad de presencia del cannabinoide, el único dato del que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos.

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Casos de muertes relacionadas con el consumo de marihuana.

Del total de las muestras de sangre postmortem recibidas en el Laboratorio de Química del INCIFO durante el periodo comprendido por el estudio, el 0.44% (11 casos) corresponde a casos de defunciones donde el consumo de marihuana estuvo, directa o indirectamente relacionado con la muerte del individuo al estudiar su expediente.

Al analizar este universo según el sexo, los hombres presentan la prevalencia de muerte más alta al estar bajo los efectos de esta droga, representada por el 81.82% de los 11 casos analizados, mientras que las mujeres solo representan un 8.18%; en cuanto a la edad de los individuos cuyas defunciones estuvieron asociadas al consumo de marihuana, el rango se encontró entre los 18 a 46 años.

Estos datos concuerdan con los obtenidos en la última Encuesta Nacional de Adicciones que indican que el consumo de marihuana por parte de la población masculina es mayor en comparación de la población femenina; y que la población adulta (18 a 65 años) es el grupo donde se encuentran las prevalencias más altas de consumo.

Métodos de extracción.

Como se señala en los resultados obtenidos, sólo con la técnica de ***extracción ii*** (con uso de derivatizante) fue posible aislar diferentes cannabinoides de las muestras de sangre postmortem analizadas. El éxito obtenido con esta técnica es atribuible a la hidrólisis que se realiza en este procedimiento.

Debido a la unión a proteínas cannabinoides cabe la posibilidad de que la desproteínización inicial que sufrieron las muestras control, así como la adición de un ácido fuerte (HCl 10%) pudo haber contribuido a completar la hidrólisis de los conjugados aún existentes, y por lo tanto el aumento del rendimiento de la extracción de los cannabinoides, logrando como consecuencia su posterior detección.

Químicamente hablando, los cannabinoides poseen un grupo hidroxilo unido directamente a un anillo de benceno, el cual les confiere sus propiedades ácidas. El objetivo de la *acidificación de medio* es desionizar la molécula con el fin de que ésta sea transferida a la fase orgánica.

Como ha sido referido en la bibliografía, la EFS ofrece la ventaja de ser más selectiva y permitir la preconcentración de los analitos de interés, teniendo como resultado altos porcentajes de recobro, y por consiguiente una concentración efectiva para su posterior detección en el espectrómetro de masas. El proceso de derivatización entonces también tiene como fin el potencializar la señal de los productos cannabicos presentes, y como consecuencia lograr su detección, más allá de conferirles estabilidad. Así mismo los factores que podrían determinar la posible detección de los cannabinoides son la dosis de droga que fue consumida y el metabolismo de cada consumidor.

Otro aspecto a analizar es la especificidad de cada una de las técnicas de extracción hacia los diversos productos cannabicos presentes en la muestra; su variación puede deberse a factores involucrados con el desarrollo experimental, tales como la preparación de los reactivos que se utilizan a lo largo del procedimiento experimental, el tratamiento de las muestras (pudiendo existir pérdida de los analitos), e incluso a algunas variables implicadas en el análisis instrumental por GC/MS confirmativos, por ejemplo, la eficiencia de la columna.

Detección de cannabinoides en sangre postmortem.

La detección de uno o varios cannabinoides en las diferentes muestras de sangre postmortem analizadas provee un indicio de que las personas (los cadáveres) a las cuales corresponde dicha sangre consumieron marihuana en un periodo de tiempo cercano a su defunción, sin embargo, aún sigue siendo difícil determinar cuánto tiempo pasó desde que hizo el consumo de esta.

No obstante, conociendo que el tiempo de vida media plasmático del Δ^9 -THC (principal psicoactivo de la marihuana) es de 20-36 horas, se puede presumir que

si se puede detectar este cannabinoide en sangre, la muestra fue tomada muy próxima al momento de la muerte del individuo, y por lo tanto, puede considerarse que éste se encontraba en un estado de intoxicación causado por el consumo de la marihuana.

Teniendo en cuenta esta correlación, será posible dictaminar las responsabilidades del individuo en cuestión en el acto delictivo con el que su muerte se encuentre relacionada.

VIII. DISCUSIÓN

Tomando en cuenta la importancia del esclarecimiento en cuanto al estado real de intoxicación del occiso, es que en el presente trabajo se plantea como principal objetivo diseñar una técnica de extracción para cannabinoides en muestras de sangre postmortem, que permitiera aplicar la técnica confirmativa de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas con el fin de aportar datos confiables del consumo de marihuana por parte del individuo antes de su muerte. Obteniendo como resultado la técnica de extracción en fase sólida con uso de derivatizante, convirtiéndola en la técnica más útil para el aislamiento de los analitos del resto de la matriz biológica antes de aplicar un análisis instrumental específico (GS/MS).

El hecho de que se decidiera no usar la primera técnica de extracción (*i*) en gran parte se debe al rendimiento de la misma el cual fue nulo, es decir, no se pudieron aislar analitos cannabinoides. Esto posiblemente debido a que no se realizó una acidificación del medio, justo como se usó en la segunda técnica de extracción (*ii*) cuyo objetivo de adicionar un ácido fuerte es contribuir con la hidrólisis de los conjugados aún existentes dentro de la muestra y por lo tanto desionizar la molécula con el fin de que ésta sea transferida a la fase orgánica y se aumente el rendimiento de extracción de los cannabinoides. Al igual que la adición de derivatizante cuyo objetivo fue aumentar la posibilidad de que los cannabinoides extraídos fueran detectados.

El actual trabajo aún presenta limitaciones tales como que no se cuenta con estándares de cannabinoides que podrían ayudar a cuantificar la concentración de cada uno de los productos identificados mediante la GC/MS, sin embargo es importante destacar el laboratorio de Química Toxicológica del INCIFO ya que desempeña un papel importante para el esclarecimiento de la muerte de los occisos por lo que este trabajo es de gran importancia ya que no se conoce institución mexicana que en la actualidad de resultados tan precisos sobre el estado de intoxicación con el que se presentaba el individuo justo antes de su muerte.

IX. CONCLUSIONES

La aplicación de la técnica inmunoenzimática múltiple (EMIT) para una detección preliminar de productos cannabicos presentes en muestras de sangre postmortem, fue de gran utilidad para poder llevar a cabo la aplicación de una técnica de extracción de productos cannabicos presentes en muestras de sangre de origen postmortem mediante el empleo de la extracción en fase sólida (EFS), la cual pudo aislar de la matriz biológica a los cannabinoides presentes, para su posterior identificación mediante la aplicación de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

Por lo tanto es posible considerar a esta pericia como una técnica de extracción útil para el análisis toxicológico de futuros requerimientos judiciales que así lo precisen una vez que se hayan validado los métodos, para así garantizar la fiabilidad de los datos obtenidos.

X. PERSPECTIVAS

Como ya se mencionó con anterioridad el no contar con estándares que contribuyan con la cuantificación de los cannabinoides presentes en la muestra y

dado que el modelo experimental diseñado en este proyecto se enfoca solamente a plantear una técnica de extracción para los productos cannabicos presentes en muestras de sangre postmortem, el proceso de validación, tanto del método como del sistema, podría ser considerado en un futuro como una nueva línea de investigación que dará continuidad al presente estudio.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Agilent Technologies Guía de selección de columnas Agilent J&W para GC [Libro]. - México : [s.n.], 2015. - págs. 11-27.

Arévalo Martín Angel [y otros] Guía Básica sobre los Cannabinoides [Libro] = SEIC. - Madrid : Ministerio del Interior, 2002. - pág. 14.

Baquero Quirós Miriam Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases [Libro]. - Costa Rica : Editorial Universidad de Costa Rica, 2006. - págs. 14-28.

Casas J. M. [y otros] Análisis instrumental 2: Cromatografía y electroforesis [Libro]. - Barcelona : UPC, 2004. - pág. 250.

CromLab S.L. CromLab S.L. [En línea]. - 2015. - http://www.cromlab.es/EFS_Principal.htm.

Encuesta Nacional de Adicciones Drogas Ilícitas [En línea]. - 2011. - 2015. - http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/ENA_2011_DROGAS_ILICITAS_.pdf.

Flanagan Robert J. [y otros] Fundamentals of analytical toxicology [Libro]. - Inglaterra : Wiley, 2007. - págs. 321-323.

García Rodríguez S. y Giménez M. P. Recursos humanos e instrumentales en un laboratorio toxicológico forense [Publicación periódica] // Revista de Toxicología. - España : [s.n.], 2005. - 1 : Vol. 22. - págs. 1-11.

González Garrido Andrés Antonio y Matute Esmeralda Cerebro y Drogas [Libro]. - México : El Manual Moderno, 2013. - pág. 196.

Grotenhermen Franjo Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide [Publicación periódica] // Cannabinoids. - 2006. - 1 : Vol. 1. - págs. 10-14.

Gutiérrez M. C. y Droguet M. La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas: Identificación de Compuestos Causantes del Mal Olor [Publicación periódica] // Identificación Compuestos Volátiles por CG-MS. - U.P.C : [s.n.], 2002. - 122. - págs. 35-41.

Hombreiro Noriega Luis El ADN de Locard. Genética forense y criminalística [Libro]. - Madrid : Reus, S.A., 2013. - pág. 20.

Huestis Marilyn A., Hennungfield Jack E. y Cone Edward J. Blood cannabinoids. II. Models for the prediction of time of marijuana exposure from plasma concentrations of delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol (THCCOOH) [Publicación periódica] // Journal of Analytical Toxicology. - Sep-Oct de 1992. - 5 : Vol. 16. - págs. 283-290.

- Instituto de Ciencias Forenses** Instituto de Ciencias Forenses [En línea]. - 2010. - 2015. - <http://www.semefo.gob.mx/swb/>.
- Karch Steven B.** Drug abuse handbook [Libro]. - Estados Unidos de América : CRC Press, 1998. - págs. 679-680.
- Lamarque Alicia [y otros]** Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica. [Libro]. - Argentina : Encuentro, 2008. - pág. 51.
- López Mesas Montserrat** Análisis de pesticidas en efluentes procedentes de Lavados de lana. Tesis doctoral-UPC. [Libro]. - Cataluña : Universidad Politécnica de Cataluña, 2002. - pág. 278.
- Madoz Gúrpide Agustín y Ochoa Mangado Enriqueta** Manejo del consumo de cannabis en población joven [Publicación periódica] // Atención Primaria. - Junio de 2011. - 6 : Vol. 43.
- Marín Gutiérrez Isidro** El movimiento social cannábico [Libro]. - Granada : Universidad de Granada, 2002. - pág. 7.
- Mendoza Patiño Nicandro** Farmacología médica [Libro]. - México : Editorial Medica Panamericana, 2008. - págs. 779-782.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad** MSSSI [En línea]. - 2006. - <http://www.msssi.gob.es/gabinetePrensa/notaPrensa/pdf/21102009Cannabis.pdf>.
- Moffat Anthony C. [y otros]** Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material [Libro]. - Londres : Pharmaceutical Press, 2011. - 4ta. : pág. 19.
- Olano D., Rodríguez S. y Prieto A.** Análisis de drogas de abuso en muestras biológicas [Informe] / Ilustre Colegio Oficial de Químicos. - Sevilla : [s.n.], 2013. - pág. 13.
- Otín del Castillo José María** Psicología Criminal, técnicas aplicadas de intervención e investigación policial [Libro]. - España : Lex Nova, 2010. - 2a : pág. 24.
- Palencia Aura, Romero Gabriela y Dubaj de Danielle Ewwa** Las muestras en toxicología forense [Publicación periódica] // Salus / ed. Carabobo Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de. - Venezuela : [s.n.], Diciembre de 2008. - págs. 92-100.

Pascual Simón José Ramón y Fernández Rodríguez Bárbara Leonor Consideraciones Generales sobre Drogas de Abuso [Publicación periódica] // MEDISAN. - 2002. - 4 : Vol. 6. - págs. 58-71.

Pascual Simón José Ramón y Fernández Rodríguez Bárbara Leonor Consideraciones generales sobre drogas de abuso [Publicación periódica] // MEDISAN. - Santiago de Cuba : Centro de toxicología y biomedicina, oct-dic. de 2002. - 4 : Vol. 6. - págs. 58-71.

PerkinElmer Manual de Cromatografía de Gases [Libro]. - México : PerkinElmer, 2015. - págs. 14, 19 y 26.

Remington Farmacia [Libro]. - [s.l.] : medica panamericana, 2000. - 20a : Vol. 1 : pág. 873.

Repetto Jiménez Manuel y Repetto Kuhn Guillermo Toxicología fundamental [Libro]. - España : Diaz de Santos, 2009. - Cuarta : págs. 528-535.

Rodríguez Carranza Rodolfo Los productos de Cannabis sativa: situación actual y perspectivas en medicina [Publicación periódica] // Salud Mental. - Ciudad de México : UNAM, 2012. - 3 : Vol. 35. - págs. 247-256.

Sánchez Loyo Luis Miguel y Ramos Loyo Julieta Relación entre el comportamiento suicida y las adicciones [Sección de libro] // Cerebro y Drogas / aut. libro González Garrido Andrés Antonio y Matute Esmeralda. - México : El Manual Moderno, 2013.

Secretaría de Salud Drogas ilícitas [Libro] / ed. Psiquiatría Instituto Nacional de. - México : Secretaria de Salud, 2012.

Sigma-Aldrich BSTFA+TMCS [En línea]. - 2000. - 2015. - https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/4747.pdf.

Stashenko Elena E. y René Martínez Jairo Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS [Publicación periódica] // Scientia Chromatographica. - 2011. - 1 : Vol. 3. - págs. 25-49. - 1984-4433.

Transportation Department of Rules and Regulations [Publicación periódica] // Federal Register. - 16 de Agosto de 2010. - 157 : Vol. 75. - pág. 49861.

Ullauri Patricia Gabriela Transporte de Masas en Extracción Fase Sólido-Líquido [Libro]. - Ecuador : Universidad Central del Ecuador, 2010. - págs. 8-12.

UNODC Métodos recomendados para la identificación y el análisis de los agonistas de los receptores de cannabinoides sintéticos en los materiales incautados [Libro] / ed. Unidas Naciones. - Naciones Unidas : [s.n.], 2014. - pág. 23.

Valdebenito Zenteno Gabriela y Báez Contreras Maria E. Estudio criminal [En línea] = Química forense: química analítica aplicada a la criminología // Especialistas en criminología y derecho penal. - 2014. - <http://www.estudiocriminal.eu/media/Quimica%20Forense%20Quimica%20Analitica%20Aplicada%20a%20la%20Criminologia.pdf>.

XIII. ANEXO

XIII.I ABREVIATURAS

µg	Microgramos
µL	Microlitros
AMP	Adenosín Monofosfato
AMPc	Adenosín Monofosfato Cíclico
ATP	Adenosín Trifosfato
BHE	Barrera Hematoencefálica
BSTFA + TMCS	N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida + trimetilclorosilano
CB1	Receptor Cannabinoide de tipo 1
CB2	Receptor Cannabinoide de tipo 2
CBC	Cannabicromeno
CBD	Cannabidiol
CBG	Cannabigenol
CBN	Cannabinol
CI	Ionización Química
DCE	Detector de Captura de Electrones
EFS	Extracción en Fase Sólida
IE	Impacto de Electrones
ELL	Extracción Líquido-Líquido
EMIT	Técnica Inmunoenzimática Múltiple
ESL	Extracción Sólido-Líquido
DIF	Detector de Ionización de Flama
g	Gramos
G6P	Glucosa-6-Fosfato
G6PDH	Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa
GC	Cromatografía de Gases
GC/MS	Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas
HCl	Ácido clorhídrico

HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia)
INCIFO	Instituto de Ciencias Forenses
Ion Trap	Sistema de Trampa de Iones
kg	Kilogramos
m/z	masa/carga
mg	Miligramos
mL	Mililitros
MS	Espectrometría de Masas
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Deshidrogenasa o Ubiquinona Oxidorreductasa
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
OMS	Organización Mundial de la Salud
SAMHSA	Sustance Abuse and Mental Health Service Administration, (Sustancias de Abuso y Administración de Servicios de Salud Mental)
SAT	Sistema Analítico Toxicológico
SEMEFO	Servicio Médico Forense
RIS	Registro de Iones Seleccionados
DCT	Detector de Conductividad Térmica
THC	Tetrahidrocannabinol
TOF	Tiempo de Vuelo
UNODC	Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito
Δ^9- THC	Delta-9-Tetrahidrocannabinol