



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN**

**EFFECTO DE LA MATRIZ BIOLÓGICA EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS PARA EL ANÁLISIS DE DROGAS DE ABUSO**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**PRESENTA  
ANGELICA MUÑOZ GARNICA**

**CIUDAD DE MÉXICO**

**2016**



Ciudad Universitaria, CDMX



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:** Alejandra Quijano Mateos  
**VOCAL:** Héctor Javier Pérez Cano  
**SECRETARIO:** Luz Alejandra Castillo Alanís  
**1er. SUPLENTE:** Fernando Rodríguez Ramos  
**2° SUPLENTE:** Benjamín Parada de la Cruz

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**FACULTAD DE MEDICINA. CIENCIAS FORENSES, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**M. en C. LUZ ALEJANDRA CASTILLO ALANÍS**

**SUSTENTANTE:**

---

**ANGELICA MUÑOZ GARNICA**





# INDICE

---

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
OBJETIVOS .....	3
OBJETIVO GENERAL .....	3
OBJETIVOS PARTICULARES.....	3
METODOLOGÍA.....	4
TIPO DE ESTUDIO .....	5
IMPORTANCIA DEL ESTUDIO .....	5
LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	5
ANTECEDENTES .....	6
LA DROGA Y EL FÁRMACO PSICOACTIVO.....	6
<i>CLASIFICACION DE DROGAS DE ABUSO</i> .....	9
OPIO.....	10
<i>ASPECTOS HISTÓRICOS</i> .....	10
<i>ASPECTOS QUÍMICOS</i> .....	11
<i>FARMACOLOGÍA</i> .....	17
<i>FARMACOCINÉTICA</i> .....	23
<i>FARMACOGENÉTICA</i> .....	27
<i>EPIDEMIOLOGÍA</i> .....	29
<i>LEGISLACIÓN</i> .....	35
<i>TOXICOLOGÍA</i> .....	35
<i>PRUEBAS TOXICOLÓGICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO</i> .....	37
<i>ELECTROFORESIS CAPILAR</i> .....	53
TÉCNICAS DE PREPARACIÓN O PURIFICACIÓN DE LA MUESTRA.....	55
PARAMETROS EVALUADOS EN UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO.....	59
EFFECTO DE LA MATRIZ.....	62
MATRICES BIOLÓGICAS .....	66
ORINA.....	68
CABELLO .....	77
SALIVA.....	90



---

CONCLUSIONES.....	98
PERSPECTIVAS .....	100
ÍNDICE DE TABLAS .....	101
ÍNDICE DE FIGURAS.....	102
GLOSARIO.....	103
BIBLIOGRAFÍA.....	106



---

## ABREVIATURAS

6-AM: 6-acetilmorfina

APCI: Ionización química a presión atmosférica

DAM: 3,6 Diacetilmorfina

DOA: Drugs of abuse. Drogas de abuso

EI: Ionización de electro impacto

ENA: Encuesta Nacional de Adicciones

ESI: Ionización por electrospray

FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

GC-MS : Cromatografía de Gases acoplado a masas

GHB: Ácido Gammahidroxiбутírico.

HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

HPLC-RP: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en fase inversa.

LAAM: Levo- Alfa-Acetil – Metadol

LC: Cromatografía de líquidos

LC: Cromatografía de Líquidos

LC-MS/MS: Cromatografía de líquidos acoplado a masas en tándem.

LC-MS: Cromatografía de líquidos acoplado a masas

LGS: Ley General de Salud

LLE: Extracción líquido-líquido

LOD: Limite de Detección

LOQ: Límite de cuantificación.

MAE: Extracción Asistida por Microondas,

MAE: Extracción por microondas asistida

MSTFA: N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida



---

PLE: Extracción Líquida Presurizada

POMC: Proopiomelanocortina

SAMHSA: Substance Abuse and Mental Health Services Administration

SFE: Extracción Súper crítica de fluidos

SoHT. Society of Hair Testing

SPE: Extracción en fase sólida

SPME: Micro extracción en fase sólida.

UAE: Extracción Asistida por Ultrasonido

CE: Electroforesis capilar

MEEKC: Cromatografía Electrocinética por micro emulsión

MEKC: Cromatografía electrocinética micelar.

CEC: Electro cromatografía capilar

BGC: Butilglicidiléter.



---

## RESUMEN

Un método analítico son aquellas técnicas empleadas para separar, identificar y medir cuantitativamente uno o más componentes de una mezcla compleja. En el caso de una matriz biológica (orina, sangre, tejidos, cabello, etc.) se tiene que realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de los componentes de interés (analitos). Sin embargo, es una labor muy exigente que requiere de técnicas analíticas muy sensibles y selectivas, se debe considerar el volumen de la muestra, la rapidez de análisis, la sensibilidad y especificidad de los métodos.<sup>1</sup>

La fiabilidad de las conclusiones cualitativas y cuantitativas es requisito esencial para la correcta interpretación toxicológica, por lo tanto, los métodos que se adopten en las determinaciones deben estar debidamente validados como mínimo en lo referente a: selectividad, linealidad, exactitud y precisión, así como el límite de detección, de cuantificación y la estabilidad del analito. Algunos de los parámetros que puede resultar necesario validar son el cobro, efectos de la matriz y robustez.<sup>2</sup>

El término droga de abuso es definido por la Organización Mundial de la Salud como el tipo de sustancias que, introducidas en el organismo vivo, son capaces de modificar una o varias de sus funciones, siendo susceptibles de provocar dependencia y tolerancia que se emplean voluntariamente para fines no justificados terapéuticamente.<sup>3</sup> Estas sustancias pueden causar que el consumidor sea vulnerable o autor de agresiones leves o incluso la muerte. He de aquí que surge la necesidad de realizar un análisis para determinar sustancias de abuso en diferentes muestras biológicas.

Considerando lo anterior, en este trabajo se propone la revisión más actual sobre los procedimientos de análisis de drogas de abuso centrado en opioides, donde se le dará énfasis en una comparativa de sensibilidad, precisión,



reproducibilidad, así como el efecto de la matriz entre métodos utilizados en la práctica forense en muestras no invasivas.

## INTRODUCCIÓN

El consumo de drogas de abuso es un problema social y sanitario multifactorial, que durante los últimos 5 años se ha incrementado potencialmente a nivel mundial.<sup>4</sup> En cuestión sanitaria, se requiere de prevención, tratamiento y atención de los trastornos relacionados con el consumo y sus consecuencias para la salud. Se encuentra estrictamente regulada la producción, el comercio y el uso terapéutico y no terapéutico de estas sustancias, con el fin de proteger la salud humana.<sup>5</sup> Para llevar a cabo la legislación y el control de estas sustancias, es importante el desarrollo y la aplicación de métodos de análisis de drogas de abuso en muestras biológicas alternativas. Es por ello que surge la necesidad de esta revisión enfocada a opiáceos, debido a la gran demanda de consumo reportada<sup>5</sup> y sus complicaciones que esto conlleva, como son: drogodependencia, vulnerabilidad individual, riesgo de contraer infección por VIH o Hepatitis C, sobredosis y mortalidad.

Los opiáceos son compuestos que poseen propiedades farmacológicas de alto interés farmacoterapéutico y han sido ampliamente utilizados, sobre todo por sus efectos analgésicos. Sin embargo, estas sustancias tienen una gran capacidad adictiva y su administración incontrolada produce una serie de modificaciones en el organismo que pueden originar la aparición de un cuadro de dependencia.<sup>6, 7</sup> Estos procesos se desarrollan como consecuencia de los cambios que se producen en respuesta a la presencia repetida de la droga y que persisten durante un largo periodo de tiempo incluso después que la administración del opioide es interrumpida.



---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las drogas de abuso son importante motivo de preocupación que afecta a todos los sectores de la sociedad. En consecuencia, existe una gran necesidad para el desarrollo continuo de los métodos para la determinación eficaz de las drogas de abuso y sus metabolitos en muestras biológicas, así como darle un enfoque multidisciplinario y apoyarse entre las áreas implicadas a la correcta interpretación de resultados.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

✓ Comparar teóricamente diferentes métodos analíticos para la determinación de drogas de abuso reportados en literatura científica, en específico para opioides. A partir de sus ventajas y desventajas respecto al uso de reactivos, rapidez, utilidad y resultados reportados, en diferentes matrices biológicas. Así mismo, evaluar el efecto de la matriz biológica en diversos procedimientos de validación de métodos de determinación de drogas de abuso.

### OBJETIVOS PARTICULARES

✓ Documentar las metodologías que resultan ser apropiadas para el tratamiento, análisis e interpretación de las determinaciones de opioides en diferentes laboratorios.

✓ Comparar las técnicas analíticas en la determinación de opioides en diferentes matrices biológicas.

✓ Identificar el efecto de la matriz biológica y las consecuencias de éste, en los métodos analíticos para la determinación de drogas de abuso.



- 
- ✓ Evaluar el efecto de la matriz biológica y mediante propuestas reportadas colaborar con posibles acciones de mejora o supresión de este efecto.

## **METODOLOGÍA**

Se realizó una revisión exhaustiva y actualizada de información e imágenes relacionadas a la identificación, cuantificación y elucidación de drogas de abuso, específicamente de opioides. En general, se plantean los principales métodos analíticos, dándole énfasis a parámetros tomados en cuenta para la validación, entre ellos el efecto que implican diferentes matrices biológicas no invasivas como son: orina, cabello y saliva.

Para ello se utilizaron recursos disponibles en las bases de datos de la Dirección General de Bibliotecas (UNAM). Como estrategia de búsqueda se realizó una tabla de apoyo para la búsqueda de datos, esta tabla contiene los siguientes apartados:

- Año de la publicación. La bibliografía utilizada comprende los años 2010 – 2015, salvo algunos casos, en que era necesario utilizar referencias antiguas comparadas con las utilizadas, en las que el valor histórico, era necesario utilizar.
- Tipo de publicación. Review o artículo de la bases de datos.
- Base de datos electrónica. La bibliografía encontrada en diferentes revisas como: Journal of Chromatography A, Journal of Chromatography B, Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis, Forensic Science International, Analytica Clinica Acta, Science and justice, Drug and Alcohol dependence.
- Palabras clave: Para facilitar la búsqueda de información dentro de las bases de datos, se hizo uso de palabras que tengan relación con el tema, entre ellas: Drogas de abuso, Opiáceos, Análisis en cabello, Efecto matriz, Monitoreo biológico, Fluido oral, Análisis no invasivos, Toxicología forense, HPLC, GC/MS, detección en orina.



---

Una vez encontrada la información, se leyó y clasificó en los diferentes capítulos del presente trabajo, de acuerdo a la información proporcionada. Los resultados de estudios de análisis y determinación de opioides se incluyeron en tablas ilustrativas para cada matriz. Para cada matriz se destinó un capítulo para englobar sus características y los procedimientos reportados de análisis.

## **TIPO DE ESTUDIO**

Descriptivo, retrospectivo y bibliográfico.

## **IMPORTANCIA DEL ESTUDIO**

Este trabajo ofrece un panorama general sobre los métodos analíticos más eficientes para la identificación de opioides, confrontándolos en tiempo, reactivos, recursos, exactitud y efecto de la matriz; dando a conocer las ventajas, desventajas y limitantes para su estudio en matrices biológicas no invasivas.

## **LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

El estudio es una recopilación bibliográfica y no un trabajo experimental, por lo que no se usaron los equipos, kits comerciales ni muestras. Es importante mencionar que no se comprobarán los métodos analíticos por estudios reportados en la literatura científica.



## ANTECEDENTES

---

### LA DROGA Y EL FÁRMACO PSICOACTIVO.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a una droga como toda sustancia (química o natural) que, introducida en un organismo vivo por cualquier vía (inhalación, ingestión, intramuscular, endovenosa), es capaz de actuar sobre el sistema nervioso central, provocando modificación de una o varias de sus funciones, siendo susceptibles de provocar alteración física y/o psicológica, experimentación de nuevas sensaciones o la modificación de un estado psíquico, dependencia y tolerancia y que se emplean voluntariamente para fines no justificados terapéuticamente. <sup>3,8</sup>

Desde el punto de vista químico, fármaco es toda sustancia química de origen natural o sintético que afecta las funciones de los organismos vivos. Los fármacos que afectan específicamente las funciones del sistema nervioso central (SNC), compuesto por el cerebro y la médula espinal, se denominan psicoactivos. Estas sustancias son capaces de inhibir el dolor, modificar el estado de ánimo o alterar las percepciones.<sup>9</sup>

Se considera que una sustancia psicoactiva genera dependencia en su consumidor cuando cumple al menos tres de los cuatro requisitos<sup>9</sup>:

- I.- Síndrome de abstinencia: Genera efectos negativos al dejarse de consumir
- II.- Llevan al consumidor a la incidencia
- III.- Es utilizada con fines recreativos, no terapéuticos
- IV.- Tiene la capacidad de influir cambios sobre las funciones normales del SNC, de quien las consume.



El espectro de sustancias que se utilizan en la actualidad para alterar el ánimo y la percepción es cada vez más amplio. Dicho espectro comprende desde las sustancias que se utilizan también como medicamentos hasta drogas sintéticas de uso no clínico y preparado a base de hierbas.<sup>10</sup>

Tipo	Ejemplos	Tendencia a causar dependencia
<b>Opioides</b>	Morfina Diamorfina (heroína) Metadona Oxicodona Codeína	Muy pronunciada Muy pronunciada Muy pronunciada Muy pronunciada Muy pronunciada
<b>Depresores de Sistema Nervioso Central (SNC)</b>	Etanol Barbitúricos Anestésicos Ketamina	Pronunciada Pronunciada Moderada Moderada
<b>Ansiolíticos e hipnóticos</b>	Benzodiacepinas GHB	Moderada Probablemente moderada
<b>Sustancias psicoticomiméticas</b>	Dietilamida del ácido lisérgico	Débil o nula
<b>Estimulantes psicomotores</b>	Anfetaminas Cocaína MDMA (éxtasis) Nicotina	Pronunciada Muy pronunciada Débil o ausente Muy pronunciada

**Tabla 1 Principales sustancias de abuso.**

Fuente: Rang, 2012. Farmacología



---

En la tabla 1 se numeran grupos extremadamente heterogéneos desde el punto de vista farmacológico. Poco es lo que se puede encontrar en común desde el punto de vista molecular y celular.

El uso de drogas de abuso presupone efectos cerebrales que pueden ser agudos o crónicos. El efecto agudo e inmediato sobre el estado de ánimo es la razón por la que la droga se consume. En algunos casos, dicha acción puede ir seguida de un efecto de rebote negativo o de una fase de depresión. El uso persistente de una droga puede derivar en un uso compulsivo y desarrollo de tolerancia. La dependencia psicológica da lugar a una intensa necesidad de consumir más droga, incluso en los casos en los que el adicto se ha mantenido alejado del consumo durante meses o años.<sup>8</sup>



## CLASIFICACION DE DROGAS DE ABUSO

Existen varias formas para clasificar a las drogas. Sin embargo, en todas ellas se presentan inconsistencias, ya que algunas drogas no pueden ser ubicadas en un solo grupo. Una forma tradicional es clasificar este tipo de sustancias como se propone a continuación.<sup>8</sup>



**Tabla 2. Clasificación de las sustancias de abuso, de acuerdo a estatus legal, origen y efectos.**

Elaborado por Angélica Muñoz G



# OPIO

## ASPECTOS HISTÓRICOS

*Papaver somniferum*, adormidera o amapola es una planta endémica de algunas regiones del mediterráneo. Bien conocida por los médicos árabes, utilizaron sabiamente por sus propiedades antidiarreicas, el opio se redescubrió y reintrodujo en Europa por Paracelso, para finales del siglo XVII cuando el fármaco en cuestión era bien apreciado y utilizado por sus propiedades analgésicas, administrado vía oral en forma de “tintura de láudano”<sup>5</sup>. En muchos países orientales la opiofagia y el fumar opio provocaron devastadores efectos en la sociedad favoreciendo en algunos casos la caída de imperios como el chino; en el mundo occidental, estaba poco interesado hasta que se inventó la aguja hipodérmica y se utilizó de forma generosa los morfínicos sobre el campo de batalla, lo cual indujo verdaderas formas de dependencia. En 1806 Sertumer aisló del extracto bruto el primer principio activo, al que llamo “Morfina” en honor a Morfeo, el dios griego del sueño. Sucesivamente se aislaron dos sustancias dotadas de efectos estupefacientes, la codeína y tebaína.<sup>11,12</sup>

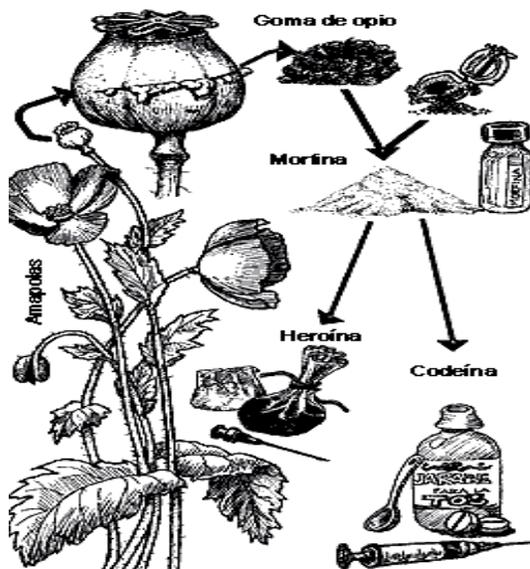


Figura 1. *Papaver somniferum*.

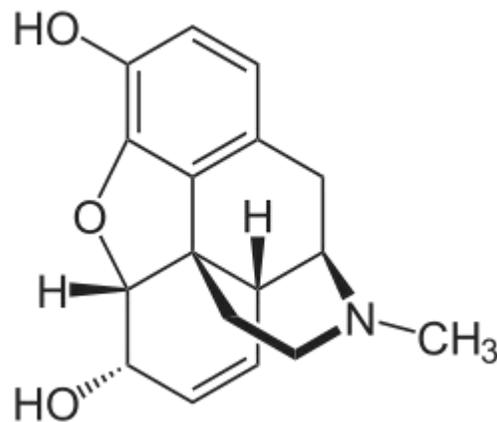
Fuente: [drogasmexico.org](http://drogasmexico.org)



## ASPECTOS QUÍMICOS

La estructura de la morfina fue establecida en 1902 y, desde entonces se han estudiado numerosos compuestos semisintéticos (producidos por la modificación química de la morfina) y completamente sintéticos.<sup>11</sup>

La morfina es un derivado del fenantreno con dos anillos planares y dos estructuras anulares alifáticas, que ocupan un plano situado aproximadamente en un ángulo recto con respecto al resto de la molécula<sup>10</sup>.



**Figura 2. Estructura de la morfina.**

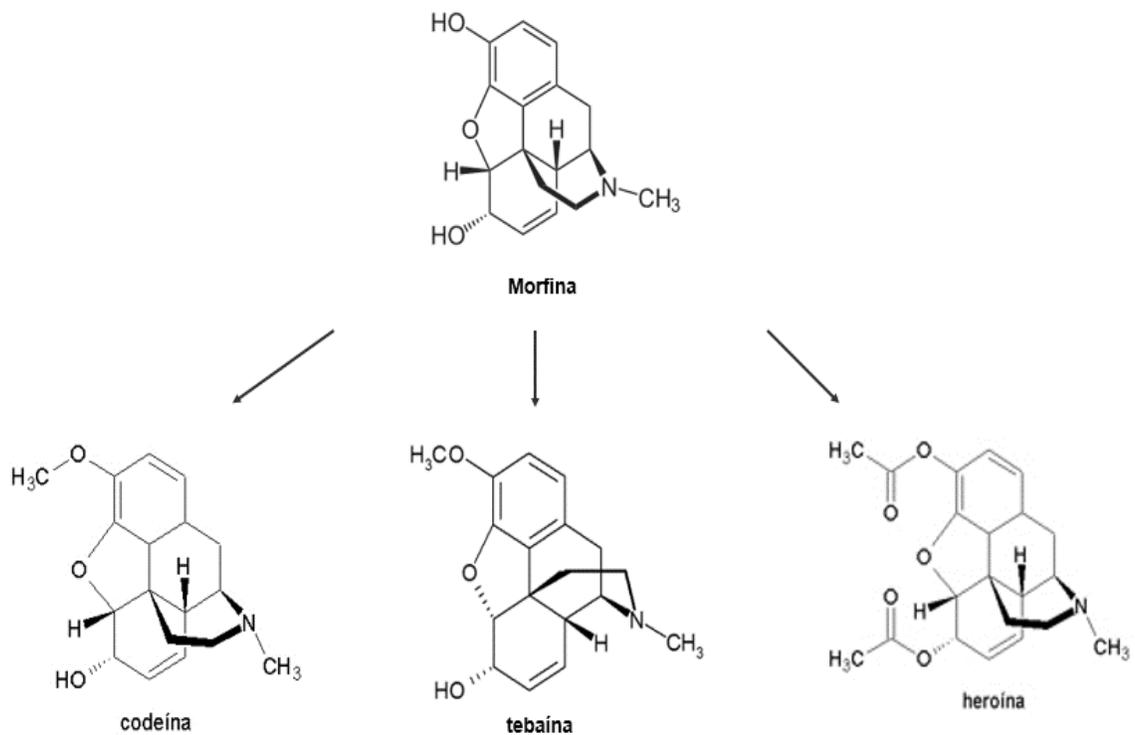
Las partes más importantes de la molécula en lo que respecta a la actividad opioide son los grupos hidroxilo libres en el anillo bencénico, unidos por dos átomos de carbono a un átomo de nitrógeno.

*Fuente: [www.cannabiscave.net](http://www.cannabiscave.net)*

El término opiáceo se refiere al origen de la sustancia con respecto al opio, es decir, son sustancias que se extraen de la cápsula de la planta del opio. Por extensión, se denominan también así los productos químicos derivados de la morfina. El término opioide se utiliza para designar aquellas sustancias endógenas o exógenas que tiene un efecto análogo al de la morfina y poseen actividad intrínseca. No todos los opioides son opiáceos, ni todos los opiáceos son opioides.<sup>6, 12</sup>



La morfina se obtiene a partir del opio, de ella se obtienen la codeína o metilmorfina, la tebaína o dimetilmorfina y la heroína o diacetilmorfina, en la figura 3 se ilustra. La buprenorfina es un derivado semisintético, que se obtiene a partir de una planta diferentes a *Papaver somniferum*. La metadona y el levo alfa acetil Metadol (LAMM) son opioides sintéticos.<sup>6,12</sup>

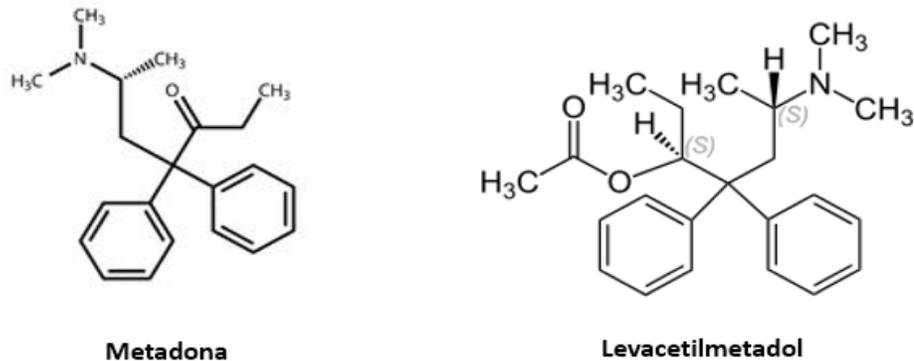


**Figura 3. Estructura de opioides derivados de Morfina: Codeína, Tebaína y Heroína.**

Se han obtenido variaciones de la molécula de morfina producidas por sustitución en uno o ambos hidroxilos

Fuente: <http://www.psicofarmacos.info/?contenido=drogas&farma=papaver-somniferum-adormidera>.

Adaptación: Angélica Muñoz Garnica



**Figura 4. Estructura de opioides sintéticos: Metadona y Levacetilmetadol.** Aunque la fórmula estructural no presenta una relación química patente con la de la morfina, la metadona adopta en disolución una conformación muy similar y fue diseñada tomando como referencia las características estructurales tridimensionales comunes de la morfina.

Fuente: <http://www.psicofarmacos.info/?contenido=drogas&farma=papaver-somniferum-adormidera>.

Adaptación: Angélica Muñoz Garnica

Se llaman opiáceos las moléculas de origen natural o apenas modificado, que se hallan presentes en cualquier parte o producto derivado de una amapola. Sus efectos farmacológicos más característicos son inducir el sueño, reducir la velocidad de tránsito intestinal, aliviar el dolor y reducir la tos. En muchas ocasiones los términos opiáceos y opioides se usan de forma intercambiable.<sup>12</sup> Las moléculas opiáceas más comunes, por su presencia natural en la amapola, son: Morfina, Papaverina, Codeína, Noscapina y Tebaína, como lo ilustra la Tabla3.

Se llaman opioides a las moléculas con efectos farmacológicos semejantes a los opiáceos pero que no tiene origen en moléculas naturales citada antes, son sintetizadas en laboratorios. Algunos de ellos, fentanilo por ejemplo, llega a ser



500 veces más potente que la morfina, considerada la molécula de referencia entre los opiáceos.<sup>12</sup>

TIPO		SUSTANCIA
<b>Opiáceos</b>		Morfina
		Codeína
		Tebaína
		Papaverina
		Noscapina
<b>Opioides</b>	<b>Semisintéticos</b>	Heroína (3, 6 diacetilmorfina, diamorfina, DAM )
		Buprenorfina
	<b>Sintéticos</b>	Metadona, Tramadol, Naloxona

**Tabla 3. Principales opioides y opiáceos.**

## RECEPTORES OPIOIDES

El cerebro humano sintetiza sus propios opiáceos endógenos. Estos son péptidos derivados de precursores de proteínas llamados Proopiomelanocortina (POMC), proencefalina y prodinorfina. La función y número exacto de opiáceos endógenos y de sus receptores, así como el papel que juegan sobre el SNC en el alivio del dolor, siguen siendo aspectos parcialmente conocidos.<sup>10,13</sup>

Los opiáceos exógenos utilizados como analgésicos, como la codeína o la morfina, o los empleados como drogas de abuso, como la heroína, actúan principalmente sobre el receptor tipo  $\mu$ , produciendo sus efectos principales en el SNC y el intestino actuando como agonistas de estos receptores, lo que provocará analgesia, somnolencia, modificación del estado de ánimo, depresión respiratoria, disminución de la motilidad intestinal, náuseas, vómitos y alteraciones del sistema nervioso autónomo y endócrino.<sup>13</sup>



EFEECTO	$\mu$	$\delta$	$\kappa$
<b>Analgesia</b>	+++	+	-
<b>Depresión respiratoria</b>	+++	++	-
<b>Constricción pupilar</b>	++	-	+
<b>Motilidad gastrointestinal</b>	++	++	+
<b>Euforia</b>	+++	-	-
<b>Disforia y alucinaciones</b>	-	-	+++
<b>Sedación</b>	++	-	++
<b>Dependencia física</b>	+++	-	-
<b>Agonistas</b>	Morfina	Morfina	Pentazocina
<b>Antagonistas</b>	Naloxona	Naloxona	Naloxona

**Tabla 4 Efectos funcionales asociados a los principales tipos de receptores opioides.**

*Fuente: Moya García Carmen, et al. Mitos y Realidades de la Heroína. 2010*

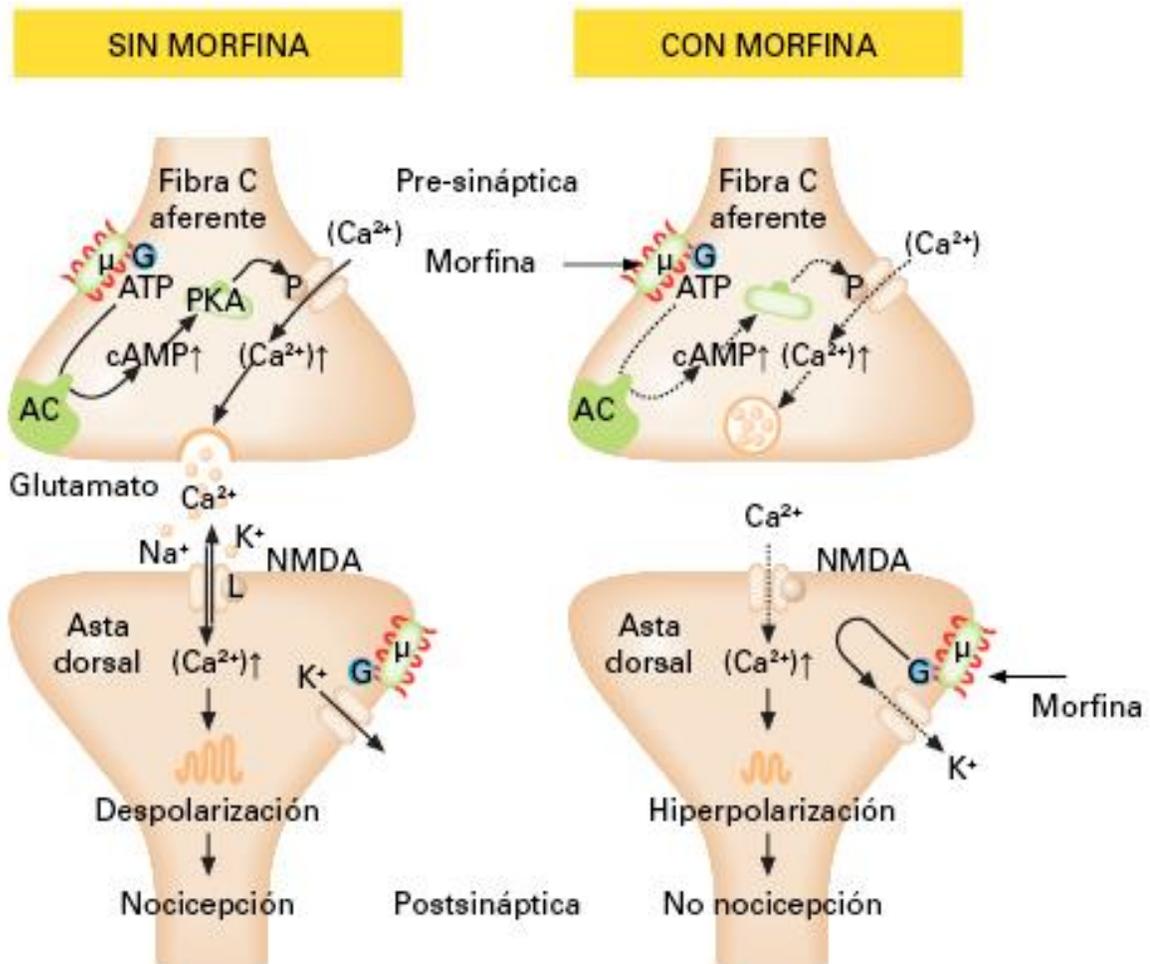
*Adaptación: Angélica Muñoz Garnica*

### **ACCIONES CELULARES DE RECEPTORES:**

Los tres tipos de receptores opioides pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas  $G_i/G_o$ . Los receptores opioides ejercen potentes efectos sobre los canales iónicos de las membranas neuronales a través del acoplamiento directo de las proteínas G al canal. Los opioides facilitan la apertura de un tipo específico de canales de potasio e inhiben la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje. Estos efectos de membrana reducen la excitabilidad



neuronal (debido al aumento de la conductancia de  $K^+$  induce hiperpolarización de la membrana haciendo que la probabilidad de activar potenciales sea menor) y disminuyen la liberación de transmisores (por inhibición de entrada de  $Ca^{2+}$ ).<sup>10,12</sup>



**Figura 5. Activación de los receptores opioides.**

Los receptores opioides son proteínas acopladas a proteínas G, y a través de esta interacción afectan las compuertas de iones, modulan el  $Ca^{2+}$  intracelular y alterar la fosforilación.

Fuente: <http://www.changepain.org/grt-change-pain-portal/231100038.jsp>



Bioquímicamente inhiben la adenilato ciclasa y producen activación de la cinasa proteína activada por mitógenos (MAP). Es probable que estas respuestas celulares sean importantes en la mediación de los cambios adaptativos a largo plazo que tienen lugar como respuesta a la activación prolongada de receptores y que, pueden relacionarse con el fenómeno de dependencia física.<sup>10</sup>

## FARMACOLOGÍA

### TERAPÉUTICA

Los opioides, son los fármacos analgésicos de referencia en el tratamiento farmacológico del dolor agudo y el tratamiento farmacológico del dolor crónico, son sustancias caracterizadas por su afinidad a los receptores opioides e implicados en otra serie de indicaciones terapéuticas como edema pulmonar, tos, diarrea, aplicaciones en la anestesia.<sup>12</sup>

INDICACIONES TERAPÉUTICAS	
<b>Dolor intenso</b>	Morfina, Oxycodona, Fentanil
<b>Edema agudo pulmonar</b>	Morfina
<b>Tos</b>	Dextrometorfano, Codeína
<b>Anestesia</b>	Fentanilo, Morfina

**Tabla 5. Indicaciones terapéuticas de los opioides y ejemplo de opioide utilizado.**

*Elaborado por Angélica Muñoz Garnica.*

Los opiáceos pueden tener un efecto agonista puro como la morfina, codeína, heroína, LAAM, petidina, fentanilo o un efecto agonista parcial como la buprenorfina o pentazocina.



---

## ANALGESIA

La morfina es eficaz en la mayoría de los tipos de dolor agudo y crónico, en general, los opioides son menos eficaces en los síndromes de dolor neuropático que en dolores asociados a lesión tisular, inflamación o crecimiento tumoral.<sup>6,12</sup>

La analgesia es la propiedad terapéutica más importante de los opioides, siendo dosis dependiente. Aliviando y suprimiendo los dolores de gran intensidad (aguda y crónica) y de múltiples localizaciones. Sin embargo, no son útiles en los dolores por desafrentización. La analgesia se debe a la acción sobre los receptores  $\mu$  que controlan las vías de dolor de la médula espinal. También poseen acciones sobre el sistema central (límbico y cortical), atenuando la percepción del tono desagradable o angustioso del dolor.<sup>12</sup>

## EUFORIA

La morfina produce una fuerte sensación de placer y bienestar que es un importante componente de su acción analgésica, puesto que la agitación y la ansiedad asociadas a las patologías o lesiones dolorosa se ven reducidas. La euforia está mediada por los receptores  $\mu$ , tanto que la activación de los receptores  $\kappa$  producen disforia y alucinaciones.<sup>7,12, 13</sup>

Cuando la morfina o diamorfina se administran por vía intravenosa, el resultado es un repentino y excesivo efecto descrito como algo similar a un orgasmo abdominal. En pacientes que presentan distrés es pronunciada, mientras que, en pacientes habituados al dolor crónico, induce analgesia, pero con euforia escasa o nula.<sup>12</sup>

## DEPRESIÓN RESPIRATORIA

La depresión respiratoria se manifiesta con dosis normales de morfina o compuestos afines, aunque en algunos pacientes con dolor grave, el grado de



depresión respiratoria puede ser menor a lo previsto.<sup>8,9</sup> Este efecto esta mediado por receptores  $\mu$ . El efecto depresor se asocia a disminución de la sensibilidad de los centros respiratorios a la  $P_{CO_2}$  arterial y a inhibición de la generación del ritmo respiratorio.<sup>7</sup>

La depresión respiratoria inducida por opioides no va acompañada de depresión de los centros medulares que controlan la función cardiovascular. Ello implica que la depresión respiratoria producida por opioides es mejor tolerada que una depresión debida, por ejemplo, a un barbitúrico. No obstante, es el efecto adverso más problemático de estos fármacos. De hecho, es la principal causa de muerte en casos de intoxicación aguda por opioides.<sup>6, 13</sup>

### *EFFECTO ANTITUSIVO*

La tos como acto reflejo está provocada por estímulos que actúan dentro o fuera de las vías respiratorias. La respuesta refleja requiere un centro integrador que programa la sucesión de mecanismos. Este centro se encuentra en el bulbo y guarda estrecha relación con el centro respiratorio, aunque parece ser independiente de él. Es evidente que sólo tiene sentido fisiológico la tos que se debe a estímulos provocados dentro de las vías respiratorias, destinadas a expulsar secreciones o cuerpos extraños.<sup>14</sup>

La Codeína, considerada como antitusígeno de referencia, es derivada de la morfina. De hecho, uno de los metabolitos de la codeína es la morfina. La elección de la codeína se debe a que las dosis eficaces están muy alejadas de las que podrían producir dependencia. La codeína puede inhibir la actividad ciliar de los bronquiolos, lo que dificulta la eliminación de las secreciones bronquiales. Esto supone un cierto grado de contraindicación para las situaciones que cursen con abundante producción de moco (asma, EPOC, bronquitis crónica).<sup>15</sup>



El Dextrometorfano guarda una inequívoca relación estructural con los opiáceos convencionales, sin embargo, carece por completo de efectos analgésicos. Entre las ventajas de la acción selectiva del Dextrometorfano cabría citar la ausencia de efecto depresor respiratorio y que no inhibe la actividad mucociliar.<sup>15</sup>

En general, el incremento de las sustituciones del grupo hidroxilo fenólico de la morfina aumenta el efecto antitusivo. Sin embargo, como efecto adverso los antitusígenos opioides producen estreñimiento<sup>6,7</sup>

### *CONSTRICCIÓN PUPILAR*

La constricción pupilar o miosis se produce por estimulación del núcleo oculomotor y está mediada por los receptores  $\mu$  y  $\kappa$ . La miosis es una importante característica diagnóstica en la intoxicación de opioides. En drogodependientes consumidores de opioides no se desarrolla tolerancia a la constricción pupilar.<sup>6,7</sup>

### *EFFECTOS SOBRE EL TRACTO GASTROINTESTINAL*

Los opioides aumentan el tono muscular y reducen la motilidad intestinal en diversas partes del sistema digestivo, lo que da lugar a estreñimiento. El retraso del vaciamiento gástrico hace que la absorción de otros fármacos se vean considerablemente retardados.<sup>6,7</sup>



## VIAS DE ADMINISTRACIÓN

Las sustancias o fármacos opiáceos se pueden administrar o consumir por diferentes vías de administración en función de la sustancia.

Vía	Heroína	Metadona	Morfina	Buprenorfina	Fentanilo	Tramadol	Pentazozina	Codeína
Oral	X	X	X	X	X	X	X	X
Intravenosa	X	X	X	X	X	X	X	
Intramuscular	X	X	X	X	X	X	X	X
Subcutánea	X		X			X	X	
Sublingual	X			X	X			
Rectal	X		X			X	X	X
Cutánea			X	X	X			
Intramuscular	X							
Pulmonar	X							

**Tabla 6. Vías de administración de los distintos opiáceos.**

Fuente: Chorro, I. M., 2011. *Toxicología Clínica*. Madrid: Grupo difusión.

## DOSIS TÓXICAS

La vía de administración más frecuente para uso recreativo es la vía intravenosa. La vía intravenosa de heroína sola se conoce en el argot como “*shutting up*”, la administración subcutánea, “*skin popping*”; el uso de la vía intranasal es el “*sniffing*” y la administración intravenosa de cocaína y heroína se conoce como speed-ball.<sup>7,16</sup>

En personas no tolerantes, la morfina produce una intoxicación grave a dosis de 200mg/kg administrada por vía intravenosa, mientras que una dosis de 120mg/kg por vía oral puede ser mortal.<sup>16</sup> La heroína a dosis de 200 mg/kg por vía intravenosa puede ser potencialmente letal en una persona no tolerante.



## INTOXICACIÓN POR OPIOIDES

---

La intoxicación por opioides produce una triada que consiste en miosis, depresión del nivel de conciencia que puede llegar al coma profundo y depresión respiratoria que se acompaña de apneas con hipoventilación alveolar que si se prolonga conduce a una acidosis mixta, convulsiones y paro cardiorrespiratorio. El edema pulmonar asociado al uso de heroína es diagnosticado a partir de la combinación de hipoxia persistente tras la resolución de la depresión respiratoria con emisión por boca, de secreciones sonrosadas y un patrón radiológico característico de infiltrados pulmonares bilaterales y difusos. <sup>7,13</sup>

## TRATAMIENTO

Los tratamientos farmacológicos para la adicción a opiáceos que se utilizan en la actualidad lo conforman dos grupos de sustancias que actúan sobre receptores cerebrales específicos; unas bloqueando el efecto de los opiáceos (antagonistas) y otras mimetizándolo (agonistas). Depende de si el objetivo es la abstinencia total o la sustitución de opiáceo, se utiliza una o la otra. <sup>7, 13</sup>

El antagonista específico de la intoxicación por opiáceos es la naloxona. Actúa bloqueando o revirtiendo los efectos de otros opiáceos, ocupando los receptores impidiendo la unión de cualquier agonista del receptor, por lo tanto bloquea los efectos. Sin embargo, no mejora el ansia por el consumo. <sup>7, 12</sup>

El tratamiento con agonistas proporciona al paciente adicto la oportunidad de reducir su exposición a conductas de riesgo y de mejorar aspectos sociales y de salud. <sup>7,16</sup>



# FARMACOCINÉTICA

---

## *ABSORCIÓN*

Los opiáceos son fácilmente absorbidos en tracto gastrointestinal, también se absorben por mucosa nasal y por los pulmones, vía subcutánea e intramuscular.<sup>6</sup> Alcanzan su concentración máxima en 1 a 2 minutos después de la administración intravenosa o fumada, 5 minutos después de la administración intranasal y a los 10 minutos de su administración subcutánea.<sup>6,7</sup>

## *DISTRIBUCIÓN*

La heroína es más liposoluble que la morfina y otros opiáceos. Atraviesa tanto la barrera hematoencefálica como la placenta.<sup>9</sup> La morfina libre abandona rápidamente la sangre y se concentra en el tejido parenquimatoso del riñón, pulmón e hígado. La morfina no se acumula en tejidos y a las 24 horas disminuyen las concentraciones tisulares.<sup>13</sup>

## *BIOTRANSFORMACIÓN*

El hígado biotransforma a la mayoría de las drogas de abuso, y estos metabolitos se excretan por medio de la orina. Grandes familias de fármacos se biotransforman en el hígado por medio del citocromo P-450, a través de las isoformas CYP3A4 y CYP2D6 que son las principales responsables del metabolismo opioide.<sup>11</sup> Las variantes genéticas de CYP3A4 y CYP2D6 se correlacionan con el fenotipo de tasa de metabolismo de fármacos.<sup>17</sup>

El genotipo de CYP2D6 determina la eficacia del tratamiento con diferentes fármacos opioides, por ejemplo, la analgesia del tramadol, por inhibición de recaptura de serotonina y noradrenalina, y la analgesia de codeína por desmetilación de pro fármaco a metabolito activo (morfina) que se ven disminuido en sujetos con metabolismo pobre.<sup>17</sup>

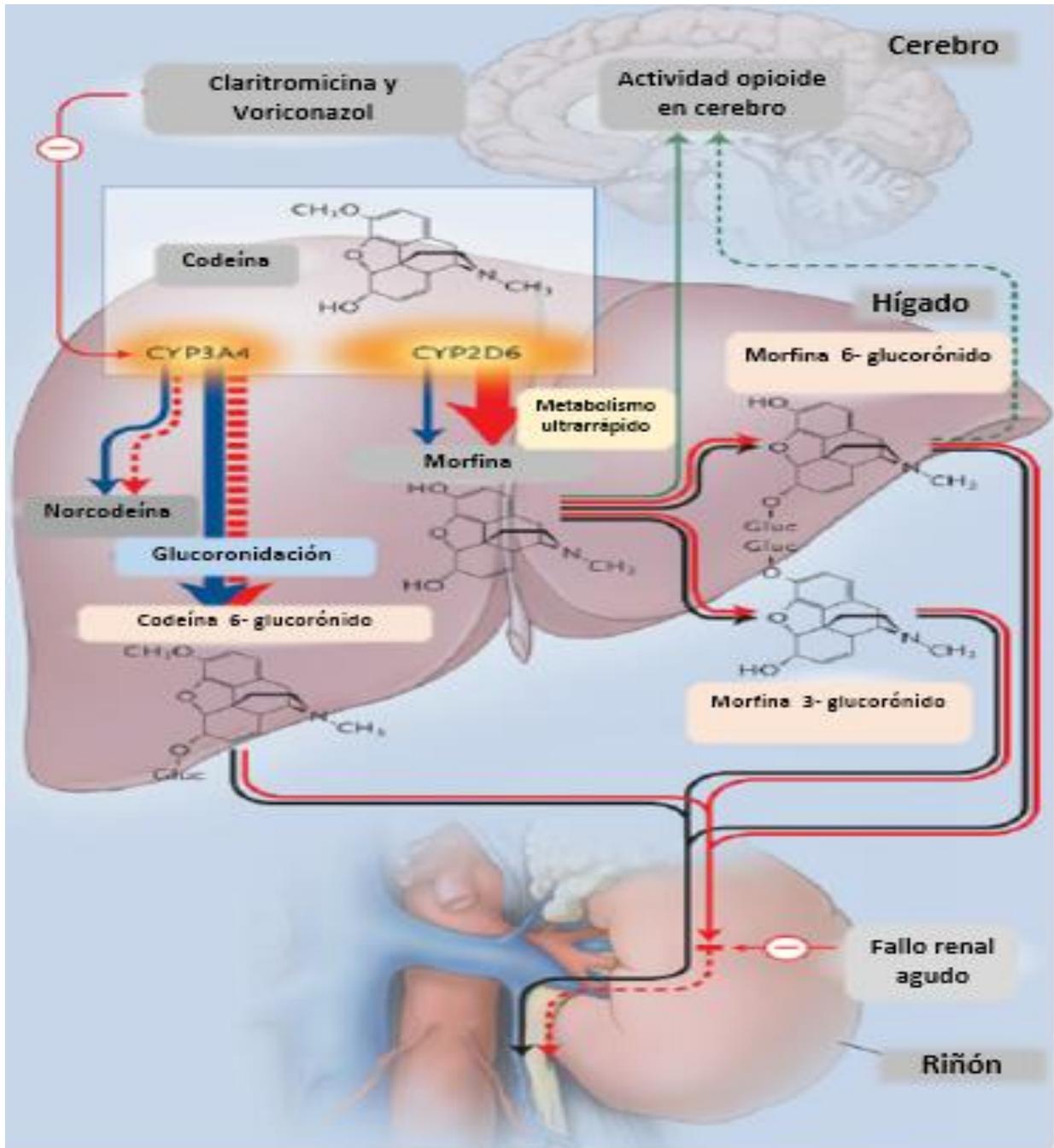


El mecanismo principal de inactivación es el metabolismo hepático que, suele consistir en una oxidación microsomal y la conjugación con ácido glucorónico.<sup>6</sup> Estas reacciones se ilustran en la Figura 6.

La O- desmetilación de la codeína en morfina por CYP2D6 representa una vía menor del metabolismo de la codeína (menos del 10%). La N-desmetilación de codeína en norcodeína por CYP3A4 y la glucoronidación de codeína son las principales vías de inactivación.<sup>18</sup>

La Heroína es producida por una modificación química de la morfina, esta se biotransforma rápidamente a 6 acetil morfina (6 -AM) por las enzimas esterases (colinesterasas y arilesterasas) en cerebro, plasma e hígado. La heroína tiene un tiempo de vida media corta de 1.3 a 7.8 min y esta no es detectada en orina después de la administración venosa a largo plazo. Por lo tanto, la presencia de la heroína no se encuentra normalmente por su tiempo de vida media corta y su inestabilidad en orina. La 6-AM es un metabolito activo de la heroína y su presencia en la orina confirma el consumo de heroína en un intervalo de tiempo de 15 a 44 h después del consumo. Se biotransforma rápidamente por desacetilación de morfina.<sup>18</sup>

La morfina es biotransformada en 2 conjugados, (Morfina 3- glucorónido y Morfina 6- glucorónido) y son excretados en orina, se ilustra en la Figura 6. La 6AM es también excretado por orina, pero tienen una ventana de detección muy corta. El tiempo de vida media de 6- AM es aproximadamente 38 min. La ventana de detección de 6AM es variable y se ha reportado por diferentes investigaciones que es de 2 a 24 horas.<sup>19</sup> La 6-AM no es producida metabólicamente en humanos de codeína o morfina, y su presencia solo puede ser encontrada por el consumo de heroína.



**Figura 6 Metabolismo de opioides.**

Fuente: Gasche Yvan, et al. Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 Metabolism

Adaptación: Angélica Muñoz Garnica



---

## ELIMINACIÓN

Los opioides se excretan fundamentalmente por orina y también por bilis, experimentando circulación entero hepática.<sup>7</sup>

La morfina se excreta con la bilis, eliminándose una parte por heces. La fracción de morfina libre en orina solo alcanza el 10% de la dosis. Aunque la heroína no se encuentra habitualmente en orina, la presencia de monoacetilmorfina confirma la administración de morfina.<sup>16</sup>

La semivida de eliminación de los opioides es corta, siendo de morfina 2 horas, heroína 0.5 h, codeína 2.8h y peptidina 3 horas; siendo la excepción la metadona, cuyo tiempo de eliminación es de 35 horas. Una de las principales vías metabólicas de eliminación de metadona es a través de una demetilación, interviniendo como enzima más importante el citocromo P450 3A 4 (CYP3A4). Por consiguiente, una inhibición del CYP3A4 tiene el potencial de aumentar y prolongar el efecto de la metadona. Son inhibidores del CYP3A4, los macrólidos, anti fúngicos azólicos, antihistamínicos, antiretrovirales.<sup>7</sup>



## FARMACOGENÉTICA

---

El dolor es un problema grave de salud mundial que afecta a un 20% de la población adulta de forma crónica. Uno de los motivos de su infratratamiento es la no adecuada selección de fármacos analgésicos. Lo que ha conllevado a la Organización Mundial de la Salud a considerar el alivio del dolor persistente como un derecho humano, estableciendo el consumo de opioides como un indicador de su tratamiento adecuado.<sup>20</sup>

Una vez diagnosticado el dolor, la siguiente cuestión es vigilar la variabilidad de los síntomas y las diferencias interindividuales en la respuesta analgesia. Este campo es el que aborda la farmacogenética. De modo en que los efectos sinérgicos o antagónicos de las variaciones en la secuencia de ADN, polimorfismo de un solo nucleótido, (*single nucleotide polymorphisms, SNP*) presentes de forma simultánea, podrían ser los responsables de que una proporción de la población tenga un efecto analgésico diferente (fenotipo).<sup>15, 20</sup>

Los SNP se consideran una forma de mutación que es exitosamente transmisible a una parte significativa de la población. Se pueden localizar en una secuencia codificante, modificando la cadena de aminoácidos que agrupan, o en regiones no codificantes, afectando al proceso de traducción (*splicing*). De esta manera, por medio de dotación genética, se podría explicar las variaciones en la acción del fármaco (farmacodinamia) o la concentración alcanzada en su lugar de acción (farmacocinéticos).<sup>20</sup> Analizando los SNP se podrían definir perfiles genéticos que colaboren a una correcta selección de fármaco, dosis, vía de administración, para lograr un tratamiento efectivo y mejor tolerado.<sup>21</sup> Sin embargo, la interpretación de los resultados genéticos es una cuestión que se encuentra en discusión debido a los diferentes mecanismos de nocicepción, a la naturaleza multigenica del dolor, escasa estandarización de análisis genéticos que requieren métodos de grandes porciones del genoma y a su costo.



El sistema CYP2D6, en particular, es el responsable de la bioactivación de los fármacos opiáceos como la codeína, tramadol, dihidrocodeína, oxicodona, hidrocodona, etilmorfina y en menor proporción de la metadona.<sup>17</sup> Este citocromo cuenta con 80 alelos descritos, que se agrupan en 4 fenotipos según su actividad biotransformadora<sup>12</sup>. Esta puede ser lenta (individuos metabolizadores lentos, *poor metabolizers, PM*), que requiere un 30% más de tramadol, por ejemplo; intermedia (metabolizadores intermedios, *intermediate metabolizers*), rápida (metabolizadores rápidos, *extensive metabolizers, EM*) y ultrarrápida (metabolizadores ultrarrápidos, *ultrarapid metabolizers UM*) que, al presentar múltiples copias del gen funcional, puede incrementar el riesgo de presentar toxicidad por somnolencia, confusión o depresión respiratoria.<sup>17, 21</sup>

La FDA, (por sus siglas en inglés: Food and Drug Administration, Administración de Alimentos y Medicamentos) alertó de casos de depresión respiratoria grave y muerte en niños con fenotipo UM tras adenoidectomía, y en la base de datos de reacciones adversas del sistema español de farmacovigilancia (FEDRA) existen cerca de 90 casos de sospecha de intoxicación por codeína en niños entre 2 y 12 años.<sup>22,23</sup>. Por lo tanto, se recomienda no prescribir codeína o tramadol a personas que puedan ser PM o UM del CYP2D6 y si no se realiza el análisis genético, no prescribir codeína a niños después de una adenoidectomía.

En un estudio realizado por la Comisión Nacional de Arbitraje Médico (CONAMED) de eventos adversos en pacientes sometidos a anestesia y analgesia neuroaxial, se observó que la intoxicación debido a los fármacos opioides tuvo una incidencia del 7.7% como origen al evento adverso. No se reporta el análisis genético para la evaluación de los polimorfismos posibles encontrados en estos pacientes con eventos adversos asociados a opioides.<sup>24</sup>



---

## **EPIDEMIOLOGÍA.**

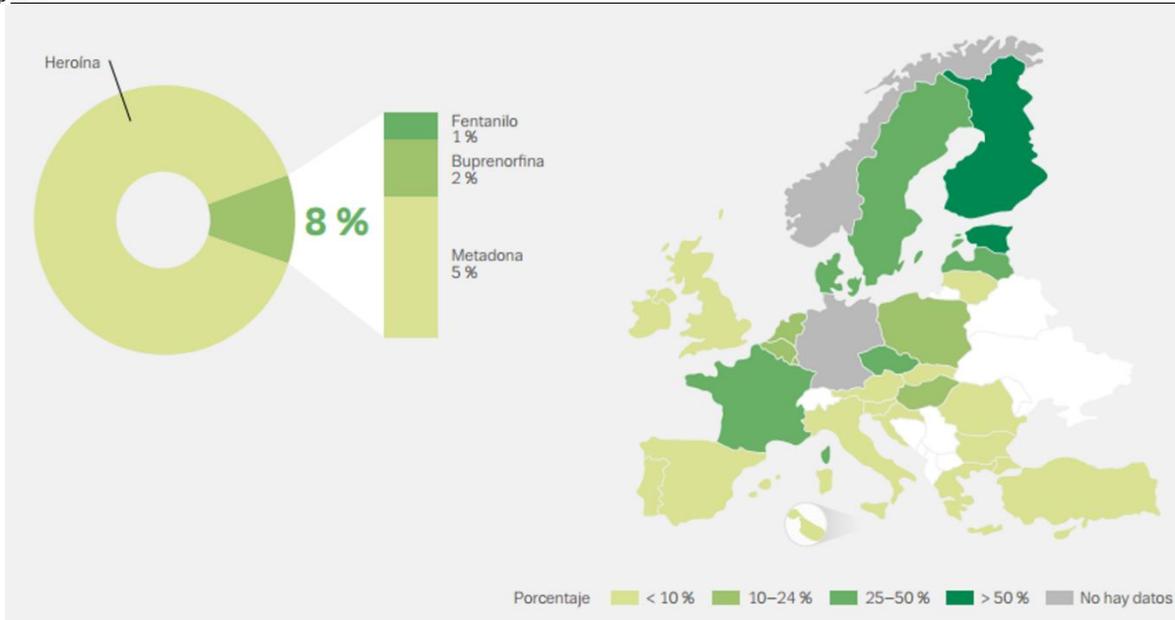
### **PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO Y CONTEXTO INTERNACIONAL**

#### EUROPA

Según el Informe Europeo sobre Drogas 2015, se estima que casi una cuarta parte de la población adulta de la Unión Europea, 80 millones de personas, han consumido drogas ilegales en algún momento de su vida. Siendo la prevalencia mayor de cannabis (78.9 millones), cocaína (15.6 millones), anfetaminas (12 millones), éxtasis (12.3 millones) y opioides (1.3 millones).<sup>25</sup>

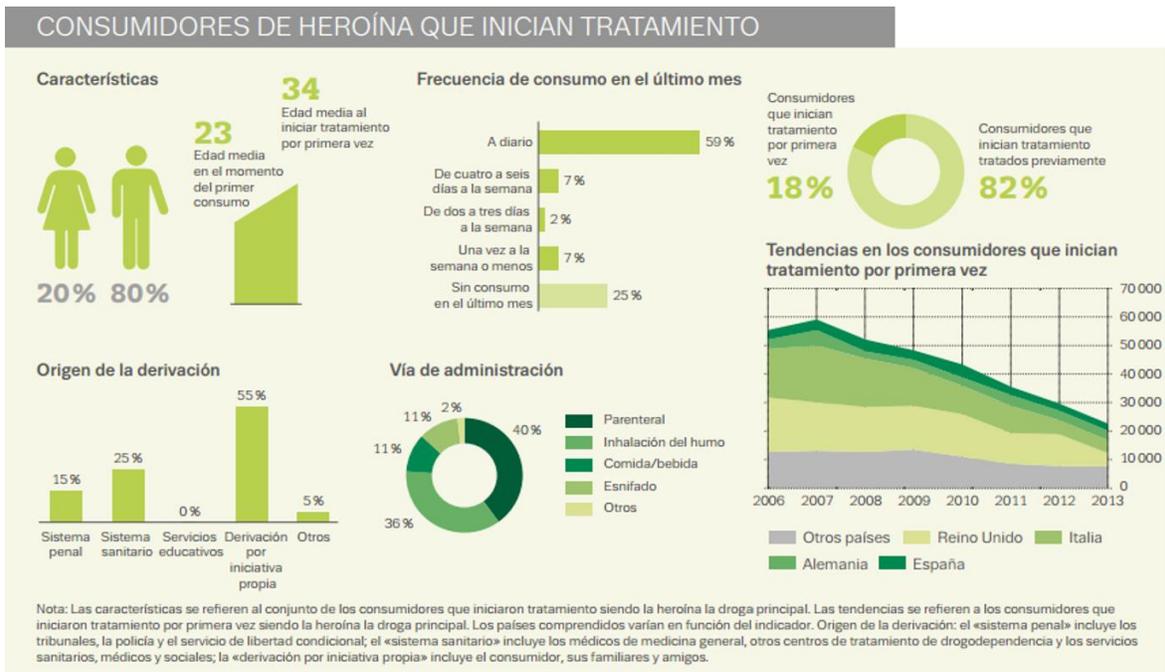
El consumo ilegal de opioides es responsable de tasas elevadas de mortalidad y morbilidad en Europa. Como puede apreciarse en el Gráfico 1, el opioide más consumido en Europa es la heroína, que puede fumarse, esnifarse o administrarse por vía intravenosa. Se realiza un consumo abusivo también de otros opioides sintéticos como la buprenorfina, metadona y fentanilo.<sup>25</sup>

El consumo de opioides se estima un 0.4% lo que equivale a 1.3 millones de consumidores problemáticos en Europa. La incidencia de consumo de opioides tiende a ser más elevado en hombres que en mujeres, siendo un estimado de 80% y 20%, respectivamente. En general, la metadona es el opioide, aparte de la heroína, cuyo consumo más se notifica, seguida de la buprenorfina; estas sustancias suponen el 60% y el 30% de todas las demandas de tratamiento de consumidores de opioides diferentes a Heroína.<sup>25</sup> (Gráfico 2)



**Gráfico 1. Consumidores de opioides en Europa y su distribución.**

Fuente: Informe Europeo sobre Drogas. Tendencias y novedades 2015



**Gráfico 2. Prevalencia de consumidores de opioides en Europa.**

Entre las características destacadas de los consumidores europeos de opioides se puede observar que existe mayor incidencia en hombres que en mujeres, así como la edad promedio del primer consumo es de 23 años, siendo diario su consumo vía parenteral (intravenosa).

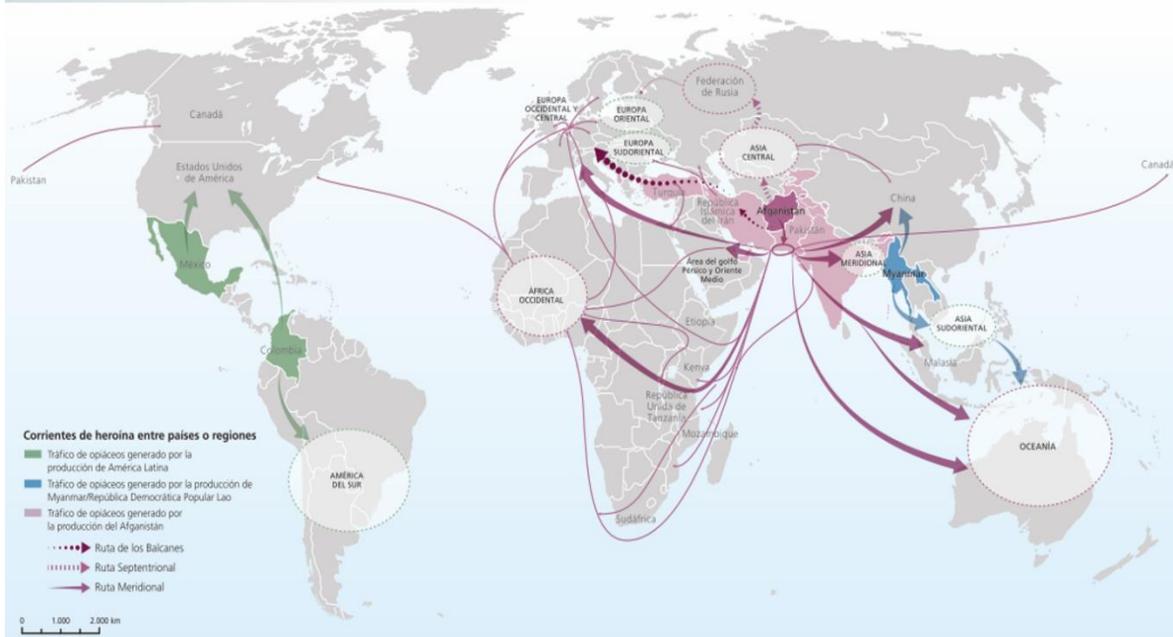
Fuente: Informe Europeo sobre drogas 2015.



## ASIA

Como se puede observar en el gráfico 3, Afganistán es el país en el que se cultiva y trafica la mayor cantidad de adormidera del mundo, durante el 2015 registró un aumento de la superficie de cultivo. La creciente importancia de África como zona de tránsito de la heroína afgana con destino a Europa y otras regiones se refleja en el número de incautaciones de heroína notificado en los últimos años por algunos países africanos, en particular en África oriental. <sup>26,4</sup>

Principales corrientes de tráfico mundial de opiáceos



**Gráfico 3. Corrientes de tráfico mundial de opiáceos.**

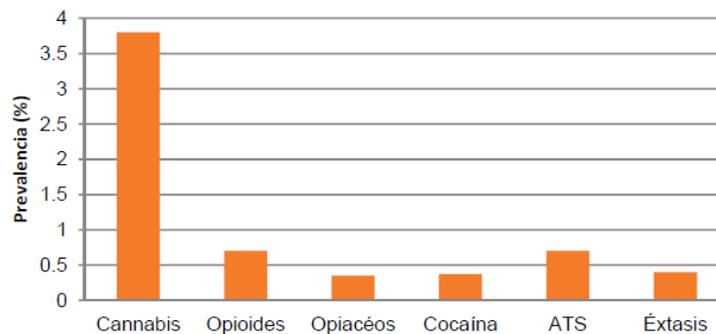
Las corrientes de tráfico mundial de opiáceos es muy importante sobre la zona del sur de Asia, ya que es el principal productor mundial de opiáceos.

*Fuente: Informe Mundial sobre las Drogas 2015.*



## AMÉRICA

Según el Informe Mundial de Drogas se estima que en América cerca de 5.2 % de la población, de entre 15 y 64 años de edad, consumieron por lo menos una vez durante el último año alguna droga ilícita, entre las que se encuentran cannabis, opioides, cocaína o estimulantes del tipo anfetamínico. Esta prevalencia respecto a al grupo de sustancias se ilustra en el gráfico 4. <sup>26</sup>



**Gráfico 4. Prevalencia de último año de consumo de drogas a nivel americano.**

Fuente: Informe del Uso de Drogas en las Américas 2015<sup>18</sup>

Desde hace varios años el consumo de heroína ha estado presente en México, Estados Unidos y Canadá, por lo que parecía ser exclusivo de dichos países, sin embargo en Colombia, República Dominicana y Venezuela se ha observado que la prevalencia del consumo de heroína ha aumentado de manera muy rápida en los últimos años, del cual se ha determinado una relación fuerte entre el cultivo de amapola y el uso de heroína en las zonas donde se cultiva la adormidera. <sup>27</sup> El aumento de presencia de heroína en distintos países americanos en 10 años, se puede observar en el Gráfico 5.



**Gráfico 5. Incidencia mundial de la presencia de heroína en 10 años (2004 a 2014)**

Países que reportaron la presencia de heroína en 2004 (A la izquierda): Canadá, Estados Unidos y México. Países que reportaron la presencia de heroína en 2014 (A la derecha): Canadá, Estados Unidos, México, Colombia, Venezuela y República Dominicana.

*Fuente: Informe del Uso de Drogas en las Américas*

A pesar de que aún hay pocos países americanos que reportan el uso de heroína, el tráfico de heroína a países donde anteriormente no lo había, presenta la preocupación de que esta sustancia podría ser un grave problema sanitario para varios países en un futuro. <sup>27</sup>



---

## PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO Y CONTEXTO NACIONAL

La Encuesta Nacional de Adicciones (ENA), llevada a cabo de manera periódica, tiene la finalidad de medir la evolución del consumo de sustancias y otras problemáticas de salud mental. La última encuesta realizada en 2011 y haciendo la comparativa de la encuesta del 2008, se observa una tendencia al incremento poblacional de consumo de drogas en hombres, que pasa de 2.5 % a 3.0 %. El consumo de las mujeres se mantiene en 0.7%. Las drogas de preferencia siguen siendo la marihuana (2.2% de incremento en hombres y 0.3% en mujeres) y la cocaína en los hombres (0.9%).<sup>28</sup>

Al analizar los datos de la ENA por región se observan tendencia de crecimiento de consumo de drogas en la región Norte del país, teniendo la prevalencia más alta de consumo de cualquier droga (2.8% poblacional) y cualquier droga ilegal (2.3% poblacional) en comparación con región Centro y Sur.<sup>28</sup> En la población mexicana el último año aumentó de 3.9 a 5.7 millones de personas consumidoras de drogas ilegales como marihuana, inhalables, cocaína, crack, anfetaminas, opioides.<sup>29</sup> La incidencia de consumo de heroína en hombres de 12 a 65 años es del 0.3%, mientras que en mujeres corresponde a menos de 0.1%.<sup>28</sup> Siendo la edad de inicio de consumo se presenta con mayor frecuencia entre los 18 y 25 años.



## LEGISLACIÓN

---

La regulación en materia legal de psicotrópicos derivados del opio, se regula por la Ley General de Salud (LGS) por los artículos 235, 236, 237, 239 y 245, donde se expresa la completa regulación por parte de la Secretaría de Salud de todo acto relacionado a sustancias enumeradas en la Fracción I que abarca desde la siembra, posesión, comercio y transporte de estas. Así como la prohibición de dichos actos en el territorio nacional.<sup>5</sup>

En cuestión de regulación sanitaria, en México para ser dispensados los analgésicos opioides del grupo I a los que se refiere el artículo 245 de LGS, se necesitan receta especial, la cual debe cumplir determinados requisitos citados en el suplemento de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) , entre los que se encuentran: código de barras y firmadas por médicos autorizados por Secretaría de Salud, así como el folio del recetario.<sup>30</sup>En tema de opio la dosis máxima de consumo personal e inmediato es de 2 gramos, diacilmorfina o heroína es de 50 mg. (*Art 479. LGS Tabla orientación de dosis máxima de consumo personal e inmediato.*)

## TOXICOLOGÍA

La toxicología forense es la rama de la toxicología que aplica métodos de investigación médico legal en casos de envenenamiento y muerte; también estudia las sustancias químicas y venenos relacionados con delitos.<sup>31</sup> Colabora con distintas áreas de análisis en diferentes casos de intoxicación, entre ellos se encuentran el uso de sustancias de abuso y el uso irracional de sustancias terapéuticas. Las pruebas utilizadas por la Toxicología forense para el estudio y determinación de sustancias se dividen en dos grupos<sup>32</sup>:

- Pruebas presuntivas o de “*screening*”: Se basan en métodos rápidos y con alta sensibilidad pero no necesariamente específicos, entre estos métodos se encuentran los inmunoensayos.<sup>32</sup>



- 
- Pruebas confirmatorias: Se basan en métodos más complejos, sensibles y específicos, tienen como objetivo confirmar o descartar una prueba presuntiva positiva. Por lo regular los métodos cromatográficos son las técnicas utilizadas como confirmatorias<sup>32</sup>

Como auxiliar de la medicina forense estudia a las sustancias químicas en relación con un hecho delictivo, estableciendo la relación existente entre las causas de la muerte y sus complicaciones; ayuda a determinar cuáles sustancias tóxicas están presentes, bajo qué concentraciones, y cuáles serían los efectos de dichas sustancias en el organismo humano.<sup>31</sup> Por lo tanto, se aplican las pruebas toxicológicas en matrices biológicas y no biológicas.



## PRUEBAS TOXICOLÓGICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO

### INMUNOENSAYOS

Los inmunoensayos son utilizados como métodos presuntivos se basan en general en procedimientos inmunoquímicos clásicos y utilizan como principio analítico la reacción antígeno – anticuerpo, donde el antígeno es la droga marcada.<sup>33</sup> Estos ensayos consisten en el desplazamiento competitivo de la droga marcada del complejo antígeno- anticuerpo por la droga libre presente en la muestra analizada. Los inmunoensayos más utilizados para detectar drogas de abuso son:

- Inmunoensayo Enzimático Multiplicado (EMIT)
- ELISA

#### ENSAYO INMUNOLÓGICO POR MULTIPLICACIÓN ENZIMÁTICA (EMIT)

La técnica de ensayo inmunológico por multiplicación enzimática (EMIT) es un análisis homogéneo sin separación, en el cual se emplea una enzima conjugada al hapteno de interés como marcador en una reacción enzima sustrato como sistema de detección.<sup>33</sup> La sensibilidad del EMIT se determina por el límite de detección de la enzima conjugada, el cambio en la actividad de la enzima conjugada luego de la unión al Anticuerpo, por la constante afinidad del anticuerpo en la reacción y por la presencia de alguna sustancia que pueda interferir en la actividad de la enzima. Su principio es que se pueden determinar la cantidad de interacción entre el hapteno y el anticuerpo utilizando un marcador enzimático. Se ha desarrollado comercialmente, para la detección de drogas antiepilépticas, drogas cardioactivas, drogas anti- neoplásicas y de abuso.<sup>34</sup>



Este inmunoensayo es muy sensible por el efecto de las enzimas utilizadas, los reactivos son baratos, por lo que pueden tener una prolongada vida media, no se utilizan reactivos radioactivos. Sin embargo, la actividad enzimática puede ser afectada por algunos constituyentes plasmáticos o de orina.<sup>35</sup> Las enzimas deben cumplir ciertos criterios para que pueda utilizarse como marcador, como bajo costo con alta pureza, alta especificidad, estable bajo condiciones del ensayo y de almacenamiento, soluble, ausente en fluidos biológicos; sus sustratos, inhibidores y factores que puedan interferir su actividad no deben existir en los fluidos biológicos.<sup>34</sup> Las enzimas más utilizadas como marcadores en estos inmunoensayos se mencionan en la tabla 7 que se muestra a continuación.

ENZIMA	FUENTE
<b>Malato deshidrogenas</b>	Mitocondrias de corazón de cerdo
<b>Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<b>Glucosa oxidasa</b>	Hongos
<b>Peroxidasa</b>	Rábano picante.

**Tabla 7. Enzimas utilizadas como marcadores en los inmunoensayos EMIT.**

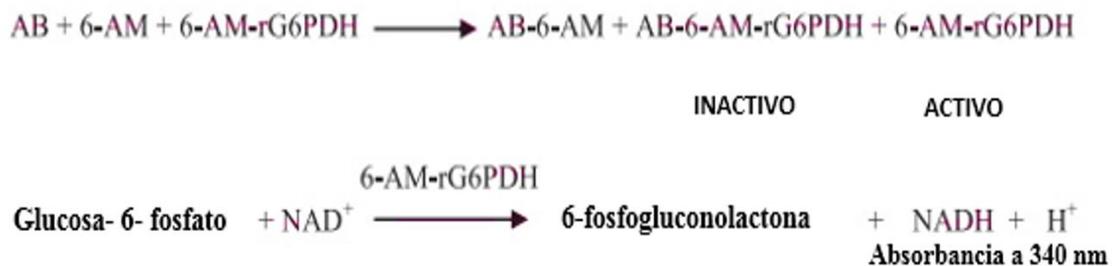
*Fuente: Pacheco Martínez N..G. Estudio comparativo de Inmunoensayo enzimático multiplicado, Radioinmunoensayos y quimioluminiscencia como métodos preliminares para detectar drogas de abuso.*

Los laboratorios en la actualidad están a favor de los métodos basados en inmunoensayos para detectar drogas. Estos métodos fueron rápidamente adoptados por los laboratorios clínicos, debido a su facilidad de uso, tiempos de respuesta rápida, disponibilidad de plataformas utilizadas para las pruebas químicas y los costos. Algunos de estos inmunoensayos se han modificado para dar cabida al análisis de otro tipo de muestra pero estas modificaciones rara vez son apoyadas por el fabricante y requieren validación.<sup>34</sup>

Los ensayos comerciales para la determinación de drogas de abuso, específicamente opioides, se basan en la competencia entre la droga en la muestra y la droga marcada con Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa recombinante (rG6PDH) u otra enzima por el sitio de unión del anticuerpo. La actividad



disminuye cuando la enzima se une al anticuerpo, y así la concentración de droga en la muestra puede medirse en base a la actividad enzimática. La enzima activa transforma la nicotinamida-adenina di nucleótido (NAD) en NADH. Esta reacción se mide espectrofotométricamente a 340nm. La actividad enzimática disminuye tras la unión de anticuerpo, lo que permite que las concentraciones de droga en la muestra se midan en términos de actividad de rG6PDH. La G6PDH sérica endógena no interfiere porque la coenzima funciona sólo con la enzima bacteriana de *Leuconostoc mesenteroides* que se emplea en el análisis.<sup>36</sup> Cuando no existen opioides en la muestra del paciente, el anticuerpo se une exclusivamente a la droga marcada enzimáticamente, quedando poca cantidad de enzima capaz de reaccionar con el sustrato y, por lo tanto, la intensidad de color detectable es baja.<sup>89</sup>



**Reacción 1. Reacción antígeno – anticuerpo del fundamento de inmunoensayo EMIT. AB: anticuerpo anti- 6AM 6-AM- rG6PDH: enzima conjugada.**

Fuente: Warren Julie. A, Siefring Gerald, et al Development of application protocols of the EMIT II Plus 6-Acetylmorphine on the ADVIA 1800 and 2400 Chemistry Systems. 2014  
Adaptación a español : Angélica Muñoz Garnica.

La 6 mono acetil morfina o 6 – acetil morfina (6-AM) es un metabolito específico de la heroína, por lo tanto la mayoría de los anticuerpos utilizados en inmunoensayos es de morfina, ya que es el metabolito común de codeína y heroína. En general, los anticuerpos específicos de opiáceos tienen mala



reactividad cruzada con oxicodona y otros opioides 6 – cetotales como oximorfona y la hidrocodona. <sup>37, 38</sup>

En el mercado científico existen varios kits de inmunoensayos de diferentes casas productoras con el mismo fundamento para determinación cualitativa de opioides en orina, entre los que destacan: SIEMENS EMIT II Plus® 6 Acetilmorphine Assay y BECKMAN COULTER EMIT II PLUS® opiate assay.

	<b>Kit comercial para la detección de opiáceos</b>	
<b>Criterio</b>	<b>SIEMENS EMIT II Plus 6</b>	<b>BECKMAN COULTER EMIT II Plus</b>
<b>Principio del ensayo</b>	Inmunoensayo Enzimático multiplicado	Inmunoensayo Enzimático multiplicado
<b>Punto de corte (cut off)</b>	10 ng/mL	300ng/mL
<b>Muestra</b>	Orina	Orina
<b>Reactivo</b>	Anticuerpo policlonal anti-cabra para morfina (4.2 ng/mL). Glucosa 6 Fosfato (10 mM) Nicotinamida adenina di nucleótido (6mM) Albumina sérica bovina Morfina marcada por G6PDH	Anticuerpo policlonal anti-cabra para morfina. Glucosa 6 Fosfato Nicotinamida adenina di nucleótido Albumina sérica bovina Morfina marcada por G6PDH
<b>Estabilidad</b>	Refrigerar a una temperatura de 4°C después de abrir el kit. Durante 4 semanas.	Refrigerar a una temperatura de 2 a 8°C después de abrir el kit. Durante 4 semanas

**Tabla 8. Características de los kits comerciales para la determinación de opiáceos.**

Se muestran las características proporcionadas por las casa productoras SIEMENS Y BECKMAN COULTER.

Fuentes:

\*<http://www.healthcare.siemens.es/drug-testing-diagnostics/emit-assays/emit-ii-plus-6-acetylmorphine-assay/technical-specifications>

\*[https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/9B052/%25%25/EN\\_OPIATES.pdf](https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/9B052/%25%25/EN_OPIATES.pdf)

Adaptación: Angélica Muñoz Garnica



---

## ENSAYO POR INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

El ensayo por inmunoadsorción se basa en el uso de antígenos o anticuerpo marcados con una enzima, de forma que los conjugados restantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción antígeno- anticuerpo queda inmobilizada y por lo tanto, es fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro. <sup>33</sup>

La diferencia principal entre las técnicas RIA y ELISA es que la primera utiliza como marcador un isótopo y la segunda la actividad de una enzima. Una de las ventajas de utilizar un ELISA como técnica de análisis es que se requiere de una cantidad de aproximadamente 50 mg de cabello, menos de 50 mL de orina y menos de 100 $\mu$ L de saliva; lo que hace que no sea destructivo ni invasiva su recolección.

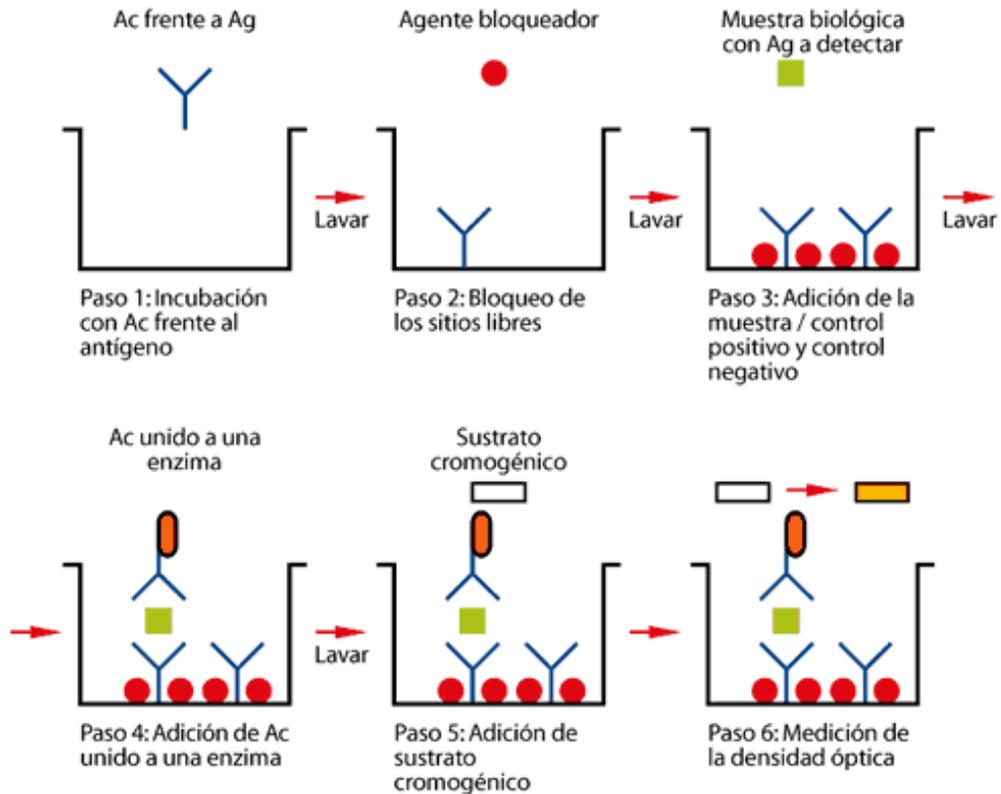
Los pasos generales de un ELISA son los siguientes<sup>33</sup>:

- 1.- Tapizado de pocillo con el antígeno o anticuerpo.
- 2.- Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos o anticuerpo.
- 3.- Unión del antígeno o anticuerpo específico al anticuerpo o antígeno tapizado en el pocillo.
- 4.- Lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido.
- 5.- Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima.
- 6.- Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo.
- 7.- Lavado del pocillo para eliminar para eliminar el exceso de enzima no unida.
- 8.- Adición del sustrato



9.- Unión del sustrato a la enzima

10.- Desarrollo y medición del color.



**Figura 7. Pasos a seguir para realizar un ELISA.**

Fuente: <http://www.bioacademia.com.mx/miembros/tecnologia/0003.html>

En el mercado científico, se encuentran varios kits comerciales para la determinación de drogas de abuso, entre los que destacan por estar referenciados en un par de artículos revisados se encuentra el kit comercial LUCIO® Direct-ELISA, que lo distribuye nal von Minden GmbH, para la determinación de opioides en orina como prueba de escrutinio y sus características que el fabricante proporciona se mencionan en la Tabla 11.



LUCIO®. Direct – ELISA					
Sustancia	Punto de corte ( ng/mL)	Sensibilidad	Especificidad	N° Muestras	Reactividad cruzada
Codeína	40	100%	81%	100	100%
Morfina	31	100%	83%	100	83%
6-MAM	31	100%	83%	100	83%

**Tabla 9 Características de Inmunoensayo LUCIO ®- Direct ELISA**

*Fuente: Agius R, Nadulski T., et al Validation of LUCIO – Direct ELISA kits for the detection of drugs of abuse in urine: Application to the new German driving license re grating. 2012*

En contraste con los ensayos de EMIT, la prueba de ELISA además de proporcionar su uso fácil, la detección se reporta rápida, automatizada y sensibilidad cerca del 100% para concentraciones de 25 ng/mL, para morfina y codeína El uso de éste kit cumple con todos los requisitos de una prueba de detección rentable: alta sensibilidad y fiabilidad, análisis de manera fácil y económica, precisión antes de realizar las pruebas confirmatorias cromatográficas/espectrométricas. Es adecuado para muestras de orina, cabello y saliva. No necesita uso de anticuerpo secundario. <sup>38</sup>



## MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

---

Las técnicas más usadas como pruebas confirmatorias en los laboratorios de determinación de drogas de abuso son: la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC).

### CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

La cromatografía de gases es una técnica utilizada para separar diferentes compuestos volátiles de una muestra.<sup>95</sup> Este tipo de cromatografía siempre es en columna, ya que es la única manera de que la fase móvil gaseosa se mantenga fluyendo confinada dentro del sistema; la columna puede estar rellena con la fase estacionaria, o bien, la fase estacionaria puede depositarse sobre las paredes de un tubo muy delgado (0.25 mm de diámetro) y largo (hasta 100 m). Este tipo de columnas se conocen como columnas capilares y proporcionan mayor capacidad de separación.<sup>39</sup>

La cromatografía de gases permite la separación de muestras complejas. Una vez separados, detectados e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema se dispone únicamente del cromatograma para la identificación de cada uno de ellos por medio del tiempo de retención, este dato no es suficiente para una identificación inequívoca de los analitos, sobre todo cuando se analiza muestras con un número elevado de componentes.<sup>39</sup>

Por otra parte, la espectrometría de masas (MS, por sus siglas en Inglés) utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa – carga. De esta manera la espectrometría de masas es una técnica analítica por medio del cual las sustancias químicas se identifican separando los iones gaseosos en campos eléctricos y magnéticos.<sup>40</sup> La MS brinda información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición atómica y molecular de materiales inorgánicos y orgánicos. Desde la década de los 60's se acopló a la cromatografía de gases, este acoplamiento permite identificar de manera casi



inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separarlos previamente, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.<sup>41</sup> Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC y MS da lugar a una técnica combinada GC- MS que permite la separación e identificación 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 muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. El único obstáculo serio a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío.<sup>39, 40</sup>

Debido al desarrollo y estudio de diversos factores importantes para una óptima separación de componentes y una adecuada detección, se han acoplado distintos detectores de formación de iones en la espectrometría de masa, como la ionización por electrospray (ESI, por sus siglas en inglés), la ionización química a presión atmosférica (APCI, por sus siglas en inglés) y el detector de ionización de llama (FID), entre otros.

Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de gases se ilustran en la Figura 8 y son:

\*Fase móvil: Generalmente son gases inertes como Helio, Argón o Nitrógeno. El gas portador lleva las moléculas del analito a través de la columna, este movimiento es inhibido por la adsorción que presenta el analito tanto en las paredes de la columna cuanto en los materiales empaquetados en la misma.<sup>39</sup>

\*Sistema de inyección: Es un dispositivo que permite la introducción de la muestra en la corriente del gas portador. Existe cierta variedad de diseños según



el tipo de muestra que se trata de analizar. El más común es el inyector de líquidos, que puede utilizarse para sólidos en disolución y gases mediante jeringas especiales. El inyector se trata de una cámara situada a la entrada de la columna y calentada independientemente de ésta, que suele tener una membrana de caucho a través de la cual se introduce la muestra con la ayuda de una microjeringa hipodérmica.<sup>39</sup>

\*Horno de la columna. En el interior se sitúa la columna, donde se debe tener una buena regulación de la temperatura. Dentro del horno la columna se conecta en un extremo al puerto de inyección, y en el otro al detector. La columna debe estar en el centro del horno sin tener contacto con las paredes.<sup>39</sup>

\*Fase estacionaria. La fase estacionaria es la encargada de separar los componentes de muestra. Esta puede ser un sólido o un líquido, dispuestos sobre un sólido que actúa como soporte, columna. El sólido de la fase estacionaria puede ser de aluminio, sílica gel, carbón o tierra de diatomea; el líquido de la fase estacionaria debe tener una baja viscosidad y una alta y diferencial solubilidad. Para su elección deben tomarse en cuenta consideraciones como: los límites de temperatura del líquido elegido, considerando viscosidad y volatilidad; posibilidad de reacciones irreversibles con la columna, fuerza de interacción soluto solvente que han de influir en los coeficientes de actividad de los componentes de una mezcla.<sup>39</sup>

Dependiendo del material es la temperatura máxima a la que se puede trabajar y se clasifican en:

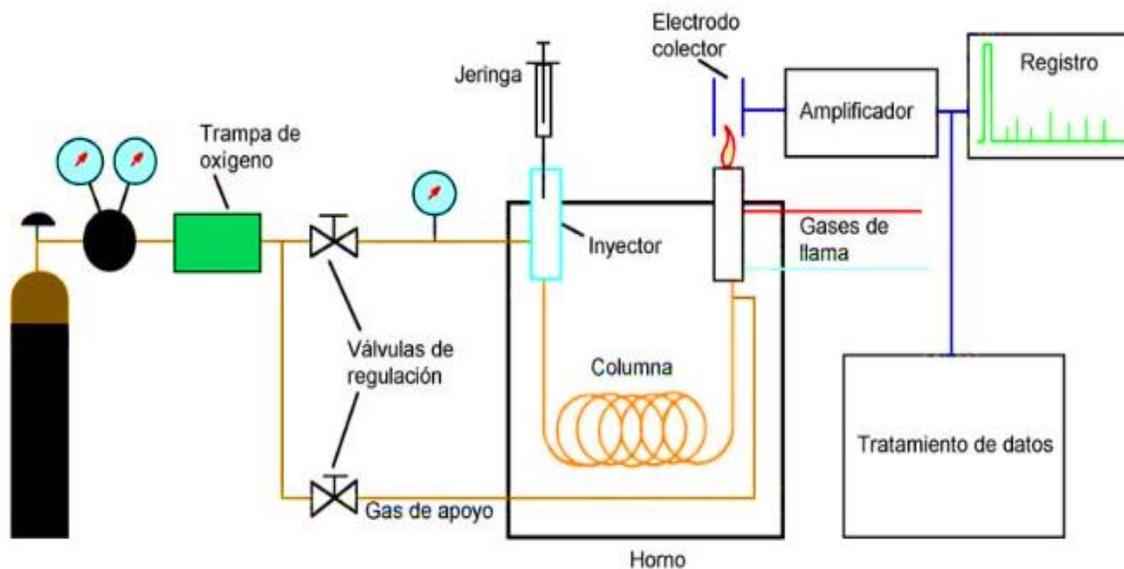
- No polares: separan sustancias poco o nada polares. Por lo general son de gomas de silicón, entre las columnas comerciales se encuentran: OV-1, OV-101 o SE-30 y se trabaja a temperaturas mayores de 300°C.



- Carácter ligeramente polar: es de utilización más común, poseen buena selectividad para mezclas mixtas. Las columnas comerciales son de Sebacato de dietil (2 butil hexilo), aceite de silicón, gomas de silicona.
- De polaridad media o alta: no apta para hidrocarburos no aromáticos. Las columnas comerciales son de aceite de Ucon LB 550X, polifenil éter, Carbowax , succinato de butanodiol.

\*Columna cromatográfica: las columnas están hechas de cobre, acero inoxidable o tubos de vidrio, dobladas o enrolladas. Tienen una longitud de 1 a 6 m de longitud y de 2 a 4 mm de diámetro. Según en ella se encuentre la fase estacionaria y el valor que alcance la relación de fases se originan los diferentes tipos de columnas. La separación de la mezcla se realiza dentro de la columna, por lo tanto es la parte más importante del cromatógrafo.<sup>39</sup>

\*Sistema de detección. Es un dispositivo que indica y miden los solutos en la corriente del gas acarreador, convirtiendo una señal no medible directamente a una señal medible y amplificada al momento de salir de la columna. Un buen detector tiene buena sensibilidad, linealidad, amplio rango de concentración y es relativamente insensible a variaciones de flujo y temperatura.<sup>39</sup>



**Figura 8 Esquema de un sistema cromatógrafo de gases.**

FUENTE: [www.mncn.csic.es](http://www.mncn.csic.es)

Los diferentes compuestos se separan en función de su grado de volatilidad (punto de ebullición, peso molecular) y su afinidad por la fase estacionaria. Entre los detectores más utilizados cabe mencionar el detector FID (ionización de flama) que por su alta versatilidad, hace posible la detección de un elevado número de compuestos.<sup>39</sup>

La derivatización es un proceso que consiste en modificar químicamente un compuesto para producir un derivado con nuevas propiedades que faciliten o permitan su análisis por GC/MS ya que mejora la volatilidad, estabilidad térmica y la detección del analito. Existen varias reacciones de derivatización como son:

- Sililación: se reemplaza un hidrógeno ácido con un grupo alquilsililo.
- Acilación: Conversión de compuestos con hidrógenos activos como -OH, -SH Y -NH en ésteres, tioles y aminas, respectivamente.



- Alquilación: Reemplazo de un hidrógeno activo en R-COOH, R-OH, R-SH, R-NH<sub>2</sub> con un grupo alquilo o arilo.

La Cromatografía de gases (GC) es una técnica comúnmente utilizada en el análisis de drogas de abuso en diferentes matrices biológicas, sin embargo es necesaria la derivatización de los analitos antes del análisis instrumental siendo este paso adicional considerado como inconveniente, ya que alarga el tiempo de análisis y puede complicar el tratamiento.

La mayoría de los métodos de GC-MS se han limitado a uno o dos grupos de fármacos, por lo tanto, este enfoque descrito es beneficioso para la toxicología forense y clínica.<sup>42 43</sup>

## CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS (LC)

La cromatografía de líquidos (LC) es una de las principales técnicas analíticas de separación, identificación y cuantificación de analitos en múltiples matrices. La popularidad de la técnica está dada por su sensibilidad, fácil de adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles; y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria.<sup>44</sup>

## CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Este tipo de cromatografía se caracteriza por la combinación de instrumentos avanzada (bombas, automuestreadores, horno para columna, detector) y técnicas que le confieren al proceso de separación una alta eficiencia y desempeño (evidenciado en alta resolución y rapidez). Las fases estacionarias se destacan por ser partículas de diámetro pequeño, permitiendo obtener columnas de mayor eficacia proporcionando amplios rangos de polaridad y selectividad. Otras de las características fundamentales es la generación de presiones elevadas debido a la



necesidad de proporcionar un flujo adecuado que permita a la fase móvil desplazarse a través de la fase estacionaria.<sup>44, 45</sup>

Las partes de un cromatógrafo HPLC se ilustran en la Figura 9 y se describen a continuación:

\*Fuente de fase móvil. Contenedores de vidrio o cualquier material inerte dentro de los cuales se coloca una línea que comienza con un filtro sintetizado poroso y por el cual viaja la fase móvil hacia el sistema de bombeo o hacia el contenedor de desechos. Algunos sistemas incorporan antes de la bomba un desgasificador para eliminar pequeñas burbujas y gas disuelto, evitándose así la desgasificación manual de los solventes.<sup>45</sup>

\*Sistema de bombeo. Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna en forma reproducible y precisa manteniendo un flujo laminar y de la velocidad constante.<sup>45</sup>

\*Sistema de inyección. Tiene como función introducir la muestra en el flujo de fase móvil que la acarreará hacia la columna. Puede ser constituido por una jeringa, un dispositivo con asas intercambiables o un inyector automático.<sup>45</sup>

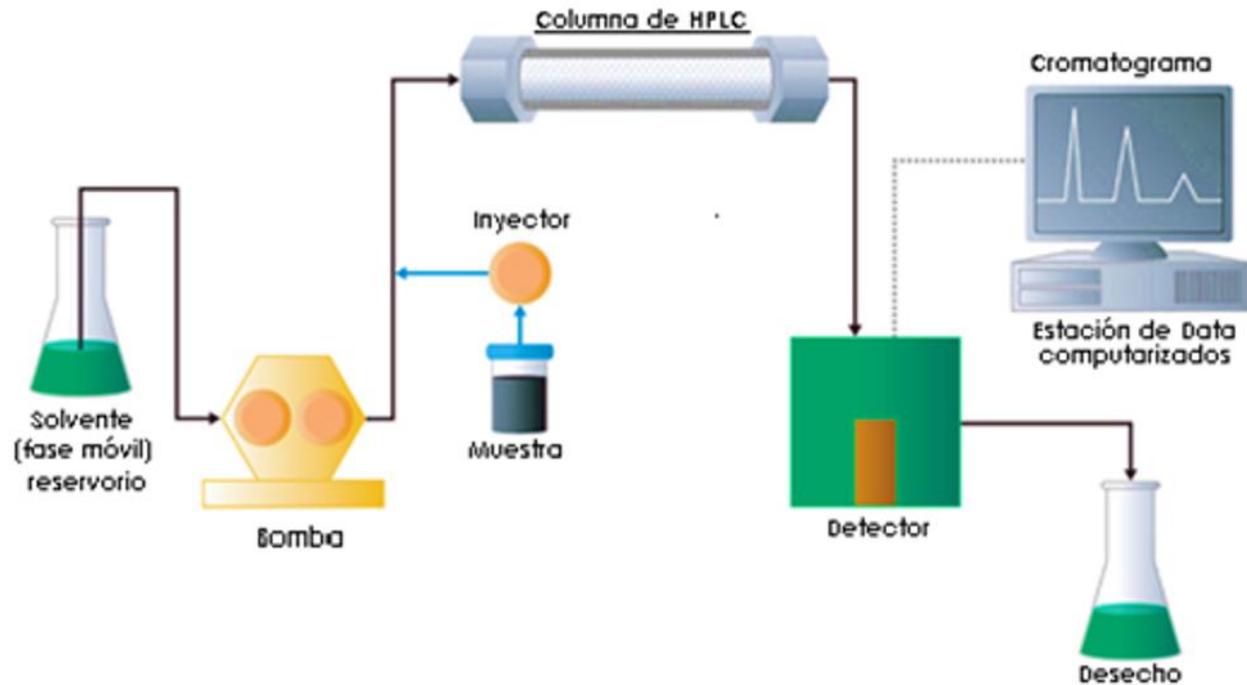
\*Sistema de separación. La columna contiene el material de empaque cromatográfico (fase estacionaria).<sup>45, 46</sup> Pueden ser de dos tipos.

- ✓ Columnas preparativas. Aísla sustancias de una mezcla.
- ✓ Columnas analíticas Permiten llevar a cabo separaciones con fin analítico cualitativo y cuantitativo.

\*\*Sistema de detección. Contiene una celda de flujo por la que pasa cada componente separado por la columna, distinguiéndolo y enviando una señal eléctrica al sistema de registro.<sup>45, 46</sup>



Sistema de registro. Permite registrar la señal emitida por el detector cuando el analito pasa por éste. Se obtiene una respuesta en función del tiempo. Puede tratarse de un graficador, integrador electrónico o sistema computarizado.



**Figura 9. Esquema de un sistema cromatógrafo de líquido.**

El HPLC emplea bombas y columnas diseñadas para soportar las altas presiones que son necesarias para vencer la mayor resistencia al flujo que ejercen estas partículas.

Fuente: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055>

Modificado: Angélica Muñoz Garnica.

El uso de cromatografía de líquido acoplado a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) es cada vez más frecuente en el laboratorio clínico y forense para el análisis de drogas de abuso. La mejora de sensibilidad y especificidad hace que las técnicas sean más útiles para el análisis simultáneo de una amplia variedad de sustancias y así la cuantificación.

El carácter polar de la mayoría de las drogas de abuso hace más adecuado el análisis por Cromatografía Líquida que por la de Gases, ya que no es necesaria la derivatización antes del análisis. Por lo tanto, LC es la técnica más apropiada para la para los análisis toxicológicos de drogas de abuso. La cromatografía Líquida



---

acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) puede utilizar ionización en electrospray (ESI) o Ionización química a presión atmosférica (APCI), siendo éste último, considerado como el método de elección para el análisis de drogas de abuso, debido a la alta relación de señal y selectividad que ofrece.<sup>42, 43</sup> La LC-MS/MS ha sido reportada como la técnica óptima para la detección de drogas de abuso, incluyendo opioides.

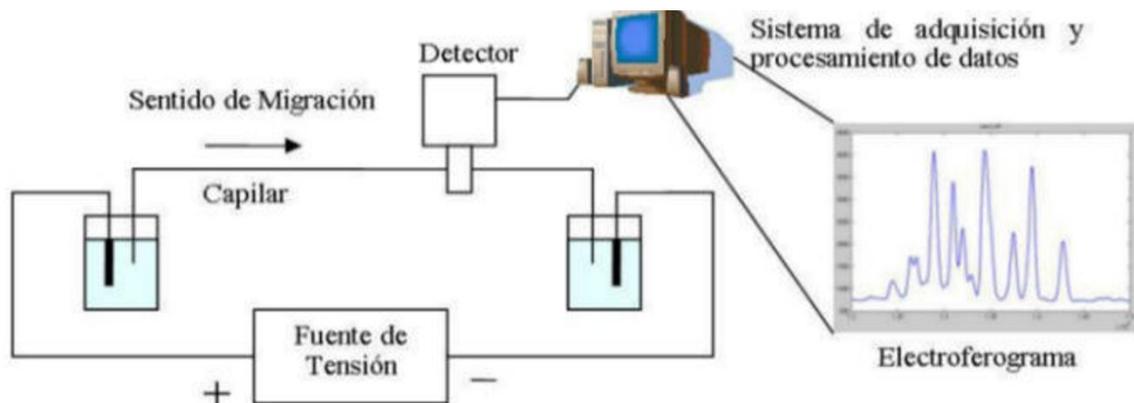
Para fines de aplicación del análisis en muestras biológicas se revisaron en la literatura reportes donde se determina 6-AM y morfina en saliva, por medio de LC-MS/MS, con una sensibilidad por arriba del 84%. Sin embargo, algunos otros opioides no fueron posibles determinar por fluido oral. Adicionalmente, mediante la utilización de un método más sensible como lo es LC-APCI MS/MS, con un límite de cuantificación de 1µg/L ha sido posible cuantificar codeína, norcodeína, normorfina, noscapina y acetyl codeína en muestras.<sup>47</sup>



## ELECTROFORESIS CAPILAR.

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa por tamaño molecular y carga eléctrica, dependiendo de la técnica que se use.<sup>48</sup>

La electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación que se ha desarrollado gracias a los avances del HPLC en conjunto con los procedimientos tradicionales de electroforesis capilar. Se basa en la migración de las especies de la muestra en disolución, portadoras de una carga eléctrica, bajo el efecto de un campo eléctrico y en contacto con un soporte adecuado. Un detector se encuentra en un extremo del capilar, que contienen una solución amortiguadora, cerca de un compartimiento catódico. La señal obtenida es la base de la obtención del electroferograma, que muestra el registro de la composición de la muestra. Solo las especies que se dirigen hacia el cátodo son detectadas.<sup>49</sup> Los métodos de detección pueden abarcar desde UV-Vis, Fluorescencia, ESI, entre otros.



**Figura 10. Sistema de electroforesis.**

El sistema electroforético está constituido por una fuente de poder de alto voltaje, un capilar de sílice, electrodos de platino, recipiente con solución amortiguadora.

Fuente:

<http://www.ing.ula.ve/patrones.electroforesis/Electroforis%20Capilar/SISTEMA%20DE%20ELECTROFORESIS%20CAPILAR.htm>



Una de las grandes ventajas que posee la electroforesis capilar, es el empleo de soluciones acuosas con baja o nula toxicidad, baja concentración iónica, e incorporación de principio de automatización a través de sistemas computarizados. Las separaciones se obtienen en pocos minutos, obteniendo simultáneamente resultados cuantitativos.

Entre las técnicas electroforéticas más utilizadas en el análisis cualitativo y cuantitativo de drogas de abuso, se encuentran:

\*Electroforesis capilar en zona o en disolución libre (CZE)

Es de uso común en Química Clínica para la separación de proteínas de suero humano, de péptidos, hemoglobinas, etc. Separa moléculas ionizadas, como nucleótidos, aminoácidos, drogas iónicas.

En el capilar fluye un electrolito en una solución amortiguadora ácida, básica o anfótera, mientras que la muestra se carga por un extremo del capilar. Al someterlo a un campo eléctrico, las especies iónicas del electrolito y de la muestra migran hacia los electrodos. Cuando haya transcurrido cierto tiempo desde el inicio de la aplicación del campo eléctrico, los componentes de la muestra migrarán cada uno a su velocidad y se separan en diferentes zonas, según la movilidad de los analitos.<sup>48</sup>

\*Electroforesis micelar electrocinética (MEKC)

La fase móvil es un compuesto catiónico o aniónico para formar micelas cargadas. Estas pequeñísimas gotitas inmiscibles con la disolución retienen a los compuestos neutros de un modo más o menos eficaz, por afinidad hidrófilahidrófoba.<sup>48</sup>



---

## TÉCNICAS DE PREPARACIÓN O PURIFICACIÓN DE LA MUESTRA.

En los laboratorios de determinación de drogas de abuso es común el uso de métodos de muestreo para limpieza o concentración de analitos para mejorar la sensibilidad de la técnica. Entre los métodos de pre- concentración, la extracción en fase sólida (SPE) se aplica a menudo para enriquecer los analitos y deshacerse de la matriz biológica de la muestra. Sin embargo, todo este proceso con múltiples pasos es mucho tiempo y requiere de gran cantidad de disolventes orgánicos.

### EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

La extracción en fase sólida (SPE, sus siglas en inglés) es una potente y simple técnica de limpieza de muestra que es, rápida y económica. Una columna SPE consiste en un lecho adsorbente de partículas gruesas mantenido entre dos discos porosos en un tubo desechable. La SPE permite pre- concentración de la muestra con un mínimo riesgo de pérdida o contaminación.<sup>50</sup>

Se utilizan las mismas interacciones muestra – fase que en el HPLC, en las que el componentes de interés resulta retenido en una fase sólida mientras que los contaminantes de la matriz se eluyen.<sup>41</sup>

Los pasos de activación de cartuchos de SPE, consisten en<sup>41</sup>:

i) Activación con disolvente orgánico para humidificar la fase.

Fase hidrofóbica (C18), se activa con disolvente polar, metanol

Fase polar (sílice) se usa disolvente no polar, cloruro de metileno.

ii) Acondicionamiento: Que permite alinear la fase estacionaria para la interacción entre analitos y la fase estacionaria. Los disolventes orgánicos

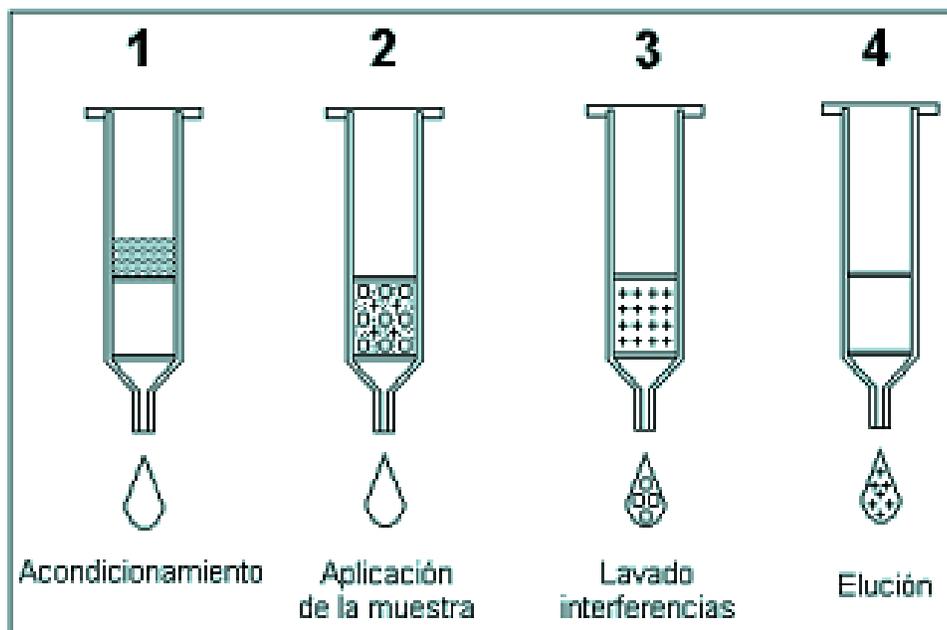


residuales se eliminan en esta etapa, asegurándose la retención de los analitos en la parte superior de la columna. <sup>41</sup>

iii) Retención: Las interacciones entre moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente de la SPE. Por medio de un flujo constante de adsorbente se eluyen y descartan los contaminantes.<sup>41</sup>

iv) Eliminación de interferencias: Usando un disolvente fuerte los contaminantes se eliminan del adsorbente hasta que los analitos queden atrapados en el cartucho.

v) Elución: La elución de los analitos se efectúa mediante un eluyente adecuado y con flujo constante.<sup>41</sup>



**Figura 11 Pasos de activación de cartucho de Extracción en fase sólida (SPE)**

Fuente: [www.analisisvinicos.com](http://www.analisisvinicos.com)

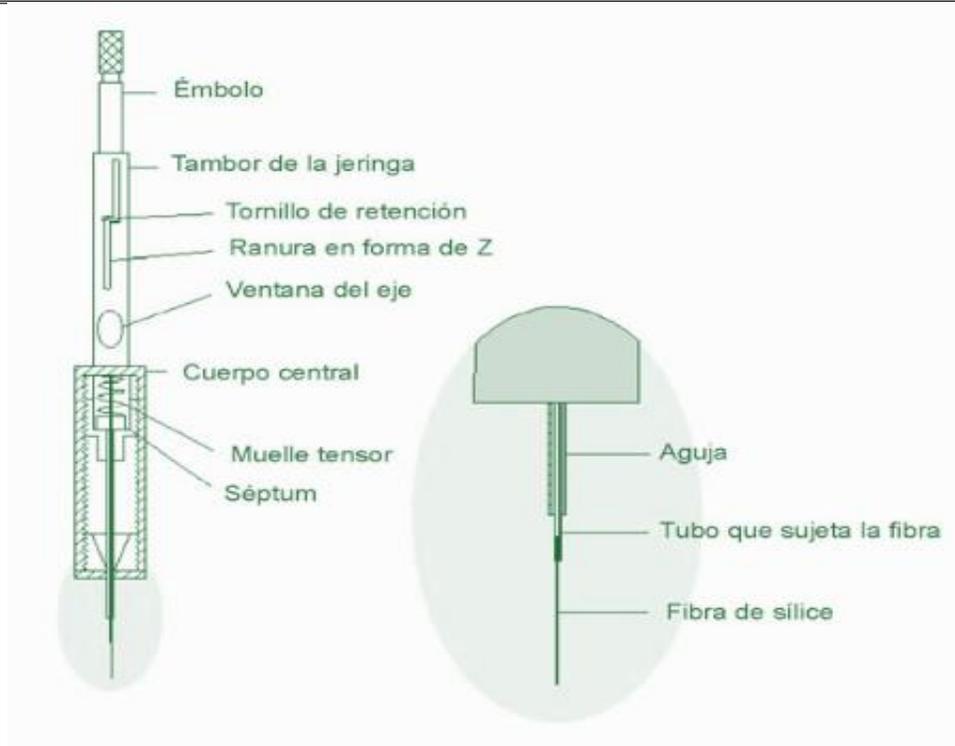


---

## MICRO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)

Se introdujo como un método de pre- concentración alternativa, ya que es un método sin disolventes que requiere una pequeña cantidad de muestra, mientras que proporciona resultados reproducibles exactos. La SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos poliméricos, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o disolvente orgánico.<sup>51</sup> El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa<sup>52</sup>, este dispositivo lo ilustra la Figura 14.

Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a las técnicas de preconcentración, ya que es muy simple, presenta bajo costo, puede ser automatizada, requiere volúmenes pequeños de muestra y generalmente no precisa de uso de disolventes orgánicos para llevar a cabo la pre- concentración, a diferencia de la SPE. Además debido a su diseño, es fácilmente transportable por lo que la hace una técnica muy adecuada para realizar análisis de campo. Otra ventaja que presenta es la posibilidad de utilizarse con todo tipo de muestras, ya sean gaseosas, de aliento, líquidas, sólidas, alimentos, etc.<sup>51</sup>



**Figura 12 Esquema de dispositivo de SPME**

Fuente: <https://ciencia.urjc.es>



## PARAMETROS EVALUADOS EN UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO

Un efectivo procedimiento analítico para la detección de drogas consiste de un procedimiento inicial sensitivo, el cual distinga entre muestras negativas de probables muestras positivas que posteriormente deben ser confirmadas por métodos analíticos altamente específicos.<sup>53</sup> La valoración de cada método deberá tener en cuenta características que deben ser consideradas como son:

1.-Especificidad: Capacidad de un procedimiento de identificar correctamente o cuantificar una entidad en presencia de interferentes en cantidades influyentes.<sup>86</sup> En los inmunoensayos esta característica es alta debido al tipo de anticuerpos que se utilizan, anticuerpos monoclonales.<sup>53</sup>

Los anticuerpos monoclonales se diferencian de otros anticuerpos porque son muy específicos para un epítotope simple en un antígeno multivalente. Se producen a partir de una línea celular simple usando tecnología para hibridomas y líneas celulares de mieloma de ratón.<sup>53</sup>

2.- Sensibilidad: Capacidad de un sistema para identificar la sustancia buscada en muestras que realmente la contengan. Cuanto más sensible sea el sistema analítico, más pequeña será la cantidad de sustancia detectada. Esto significa que una prueba que tenga una sensibilidad de 25 ng/mL estará en condiciones de detectar drogas de abuso o sus metabolitos durante un periodo más largo con respecto a lo que puede detectar una prueba con sensibilidad de 100 ng/mL.<sup>87</sup> Por lo tanto, es importante que la prueba presuntiva sea altamente sensible y tal sensibilidad sea declarada por el fabricante.<sup>53</sup>

\*Límite de detección: Aquella concentración que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones del experimento indicadas.



\*Límite de cuantificación: Se considera como la menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse con precisión y exactitud aceptable, bajo condiciones establecidas.

3.- Exactitud: Es la cercanía del valor analítico al valor “verdadero” de la concentración del compuesto de interés en la muestra.<sup>54</sup>

4.- Precisión: Grado de concordancia entre los resultados de mediciones obtenidas independientes bajo condiciones establecidas. La precisión es una evaluación estadística que mide la repetitividad de los procedimientos de prueba. No indica la exactitud del sistema, ya que un sistema analítico puede muy preciso reproduciendo errores consistentemente, sin embargo; una medición exacta debe tener una precisión aceptable.<sup>34</sup> Los niveles de precisión que definen la precisión de un método son:

\*Repetitividad. Coincidencia dentro de un periodo corto para el mismo analista con la misma instrumentación.

\*Reproducibilidad. Coincidencia en los resultados entre laboratorios, aplica para estudios colaborativos

5.- Confiabilidad Describe el desempeño esperado como resultado de una exactitud consistente. La confiabilidad es afectada por las condiciones y factores que influyen al sistema analítico y la exactitud de los resultados.<sup>54</sup>

6.- Valor de corte (cut off): Establece qué concentración de la droga debe estar presente antes de que la muestra sea señalada como positiva por el sistema.<sup>34</sup> La muestra puede ser considerada negativa si contiene la droga en concentración inferior al corte. El valor de corte debe mantenerse por encima del valor de sensibilidad declarado, sin embargo, es deseable por otra parte, poder fijar el calor de corte en relación al tipo de investigación: médico - legal, clínico, epidemiológico, analítico, etc. <sup>54</sup>



En la inmensa mayoría de los problemas analíticos tenemos que separar, identificar, y medir cuantitativamente uno o más componentes de una mezcla compleja. En el caso, en diferentes matrices biológicas se tiene que identificar y medir cuantitativamente los componentes de interés y en algunos casos realizar la determinación cualitativa.<sup>35</sup>

7.- Interferencia: Es la presencia de sustancias en la matriz o sistema que afecta adversamente la reacción química o medición de los productos de reacción. La interferencia puede causar resultados falsos elevados o disminuidos. Pueden enmascarar la presencia de drogas de abuso buscada en la matriz.<sup>35</sup>

8.- Reactividad cruzada: Tendencia de un método a reaccionar con más de una droga. Se utiliza para hacer la detección de muchos miembros de una familia de drogas con una sola prueba.<sup>34</sup>

9.- Efecto matriz: influencia de una propiedad, componente o comportamiento de la muestra, diferente del mensurando. El efecto matriz consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental.<sup>53</sup>

Las características anteriores son muy importantes para evaluar el desempeño de los métodos analíticos y así demostrar que son aptos para el propósito indicado, en este caso la determinación cualitativa y cuantitativa, de drogas de abuso.



## EFECTO DE LA MATRIZ

---

La IUPAC define el efecto matriz como: El efecto combinado de todos los componentes de la muestra que no sea analito en la medición cuantitativa. Si un componente específico puede ser identificado como causante de un efecto, entonces se le conoce como interferencia.<sup>55</sup> Cuando se realiza el análisis de una muestra, el efecto de la matriz es una de las desventajas más relevantes que el analista debe tomar en cuenta, representa una desventaja en prácticamente todas las técnicas instrumentales.

Una de las limitaciones de muchos métodos analíticos es la susceptibilidad del efecto de la matriz, que por lo general resulta como una supresión o mejora de señal a nivel de los detectores de espectrometría de masas. El efecto matriz (ME, por sus siglas en inglés) puede afectar significativamente el rendimiento del método en términos de capacidad de detección, selectividad, repetitividad, precisión y límite de cuantificación.<sup>56</sup>

Diferentes componentes endógenos de la matriz pueden ser capaces de producir el efecto de supresión o mejora de señal. Los supresores de iones son especies iónicas, compuestos polares y moléculas orgánicas como carbohidratos, aminas, urea, lípidos, péptidos, y en general, compuestos o metabolitos que se caracterizan por una estructura química similar a la del analito. En el proceso de extracción puede haber interferencias con los materiales liberados de los tubos de plástico o las columnas con los reactivos de la fase móvil, como sales, agentes de apareamiento iónico, tampones y ácidos orgánicos son responsables potenciales de la supresión de iones.<sup>57</sup>

El efecto de supresión de señal afecta la identificación y determinación de los analitos, puede producir falsos negativos y falsos positivos, por lo que la evaluación del efecto matriz debe ser incluido en la validación de métodos analíticos.<sup>56</sup> El efecto matriz dependerá de la muestra biológica (orina, plasma,



saliva, cabello, etc.), las propiedades fisicoquímicas de los analitos, el procedimiento preparativo de la muestra, las condiciones de separación, así como la fuente de ionización.<sup>58</sup> Casi todo tipo de matrices complejas analizadas por LC o GC experimentan efecto matriz.

## CÓMO EVALUAR EL EFECTO MATRIZ

Conforme a la literatura, el efecto matriz puede preverse en métodos cromatográficos acoplados a espectrometría de masas, mediante la comparación de la respuesta instrumental obtenidos para: 1) Un calibrador o un estándar interno inyectado en la fase móvil; 2) Una solución con estándar interno añadido después de la extracción ;3) Solución con estándar interno añadido antes de la extracción. De esta manera, los datos para el calibrador en fase móvil darán un valor de 100%. Los datos para la misma cantidad añadida a la muestra extraída mostrará el efecto de la matriz en la respuesta de señal, mientras que en los datos obtenidos en la muestra que se le añadió estándar interno sin extracción proporciona la información si la pérdida de señal es debido al proceso de extracción o al efecto matriz.<sup>57</sup>

Los porcentajes del efecto de matriz (ME), del recobro del proceso de extracción (RE) y la eficiencia del proceso (PE) se calculan como lo muestran las siguientes ecuaciones<sup>57</sup>:

$$ME(\%) = \frac{B}{A} 100$$

$$RE(\%) = \frac{C}{AB} 100$$

$$PE(\%) = \frac{ME * RE}{100}$$

A: Pico de la disolución estándar

B: Pico de la solución con estándar interno añadido después de extracción.

C: Área del pico de la solución con estándar interno añadido antes de la extracción.



---

Por lo tanto la identidad del efecto matriz se define como  $100 - ME (\%)$ .

Si  $ME (\%) = 100$  no hay efecto matriz presente

Si  $ME (\%) > 100$  Existe aumento de señal asociado al efecto matriz

Si  $ME (\%) < 100$  Existe disminución de señal asociado a efecto matriz.

El efecto matriz se atribuye a diferentes causas, el efecto sinergista de las condiciones del método analítico, las propiedades químicas del analito, los componentes de la matriz, procedimiento de varios pasos, condiciones cromatográficas, fase móvil utilizada o el tipo de detector de espectrometría. La supresión de señal depende de las técnicas de ionización y de los equipos. La interferencia endógena se origina a partir de sustancias que se encuentran de forma natural en la muestra del paciente y que pueden ser factores que aumenten o disminuyan la señal del analito.

Los datos de las pruebas de interferencias en EMIT indicaron que no hay interferencia significativa con las sustancias endógenas probadas a niveles similares de manera natural, como son glucosa, hemoglobina, ácido oxálico, cloruro de sodio, urea<sup>14</sup>. La evaluación se llevó mediante la evaluación del efecto matriz, con el uso de estándar interno antes y después de la extracción.<sup>57</sup> La cual no fue significativamente supresora o aumentadora de señal.

La determinación por medio de EMIT proporciona una determinación cualitativa y semi - cuantitativa precisa y con buena resolución, para la determinación de los metabolitos de heroína, 6-AM en orina. Los resultados de precisión, recobro intra ensayo, reactividad cruzada e interferencia endógena fueron aceptables.<sup>36</sup>

El efecto matriz en métodos cromatográficos se evalúa por el método propuesto por el artículo de Gosetti Fabio<sup>57</sup>, utilizando estándar interno antes de la preparación de la muestra.



---

En general, la evaluación del efecto matriz es importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de drogas de abuso, debido al aumento o disminución de las señales que se originan por sustancias endógenas. El método propuesto de evaluación del efecto matriz, ha tenido éxito en su implementación. Puede aumentar la señal o eliminar el efecto matriz, el gran reto que tienen los laboratorios es la selección de un disolvente y solución del estándar interno adecuado.



## MATRICES BIOLÓGICAS

---

La selección del espécimen biológico es un punto crítico; se deben considerar aspectos químicos, toxocinéticos y toxodinámicos. La disponibilidad de las sustancias depende de sus propiedades fisicoquímicas, vía de administración, metabolitos, duración y frecuencia de exposición. En la actualidad, surgieron avances del uso de matrices biológicas alternativas tales como el cabello, fluidos orales y el sudor para pruebas drogas.<sup>32</sup>

Una droga puede detectarse en un líquido corporal o en un tejido pero hay limitaciones prácticas que rigen qué muestras pueden ser usadas. La elección del indicador biológico está influenciada por la farmacocinética de la sustancia a detectar, y la facilidad con que pueda analizarse en el laboratorio.<sup>32</sup>

Los analitos presentes en la matriz biológica pueden indicar el tiempo de exposición. La estabilidad de los analitos depende de la matriz biológica y la correcta toma de muestra. Cabe señalar, que para realizar los estudios de determinaciones cualitativas y/o cuantitativas de matrices de diferentes participantes se apega, se lee y se contesta una carta de consentimiento informado.

La sangre y la orina son las matrices más explotadas en el ámbito forense, sin embargo, no son las únicas matrices utilizadas. Se pueden encontrar otras como saliva, sudor, cabello, semen, fluido vaginal y éstas pueden desempeñar un papel muy importante en la determinación de drogas de abuso.<sup>59</sup>

### COMPOSICIÓN DE ALGUNAS MATRICES BIOLÓGICAS

Cada fluido biológico tiene una composición única, y la presencia de componentes específicos de un fluido frente a otro es la base de su identificación, análisis y selección de métodos confirmatorios.<sup>59</sup> La composición de las matrices tratadas en este trabajo se muestran en la tabla 9.



Orina		Saliva		Cabello	
Urea	2.0 %	Agua	99.5 %	Proteínas	90%
Ácido Úrico	0.5 %	Amilasa	0.5%	Agua	5%
Cloruro	1.5 %	Lisozima		Lípidos	2%
Agua	96%	Mucina		Minerales	3%
		Células epiteliales			
		Tiocianato			
		Potasio			
		Bicarbonato			
		Fósforo			
		Glucosa			

**Tabla 10 Composición de matrices biológicas.**

*Fuente: Forensic Science International 188 (2009) 1–17*

*Adaptación: Angélica Muñoz Garnica*

El proceso para asegurar que una muestra identificada fue proporcionada por un individuo específico y ha sido correctamente etiquetada con posterioridad para asegurar la precisión debe estar adecuadamente documentado, cadena de custodia. Esto también incluye la confidencialidad y la ética en la que puedan estar implicadas las actividades legales.

A continuación se presentan algunas características, ventajas y desventajas de algunas de las matrices biológicas para el análisis toxicológico de sustancias de abuso.



## ORINA

Actualmente, la orina es el fluido biológico preferido para el análisis de uso de drogas de abuso y sus metabolitos. Mientras la tendencia reciente ha sido aplicar tecnología de laboratorio a nuevos medios biológicos, debería tenerse en cuenta que el análisis de orina es una tecnología bien conocida en la que la mayoría de los problemas han sido descubiertos y resueltos, o más bien, conocidos.<sup>60</sup>

La permanencia de sustancia en orina depende de: peso del individuo, cantidad de sustancia administrada, frecuencia, funcionamiento hepático, capacidad de adsorción. A continuación se muestra una tabla de sustancias y metabolitos, que se detectan por orina, así como la ventana de detección.

Duración aproximada de la detección de las sustancias de abuso y sus metabolitos en orina	
SUSTANCIA	DURACIÓN DE DETECCIÓN
Heroína	15 a 44 h
Morfina	15 a 44 h
Codeína	33 – 54 h
Propoxifeno	8 - 48 h
Buprenorfina	24h a 7 días
Metadona	24 - 72 h

**Tabla 11 Ventana de detección en orina de diferentes opioides**

*Fuente: Wolff K. et al Revisión de los indicadores biológicos de uso ilegal de drogas, consideraciones prácticas y utilidad clínica. 2011. Revista de toxicomanías*

*Adaptado por: Angélica Muñoz Garnica*



---

## TOMA DE MUESTRA

Antes de la toma de muestra, se le solicita al paciente despojarse de sus objetos personales y al agua. Esto con el fin de evitar la adulteración de la muestra. La toma de muestra consiste en recoger una muestra de orina con micción normal, en un recipiente que se le otorga en el laboratorio.

Inmediatamente de la recolección de la muestra de orina, debe registrarse su temperatura y el pH. La temperatura debe estar entre 32 – 37 °C y el pH entre 4.5 y 9.0. Los aspectos de relevancia como color y volumen también quedan registrados. Las muestras de orina deben ser almacenadas a temperaturas de refrigeración de: 4°C – 8°C, hasta por una semana. Para periodos más prolongados, semanas o meses, se debe congelar a -20°C.

Con el fin de eludir los resultados falsos positivos debido a la ingestión de opiáceos, SAMHSA (Administración de Abuso de Sustancias y Servicios de Salud Mental, por sus siglas en inglés) recomienda un valor de corte de 2,000 ng/ mL para las pruebas presuntivas. Sin embargo, para la pruebas confirmatorias, se han utilizado 300 ng/ mL.<sup>61</sup>

## DETERMINACIÓN PRESUNTIVA

El *kit* comercial para la determinación presuntiva de opioides en orina, que ha reportado la detección de 6-AM sin reactividad cruzada con morfina, metabolitos de morfina, codeína y otros opioides es EMIT II Plus® 6 *acetymorphine Assay*, que proporciona alta selectividad para la determinación cualitativa de heroína y 6- AM en orina.

En un análisis realizado con EMIT II Plus® 6 *acetymorphine Assay*, se comparan los resultados cualitativos de 25 µL de orina, en términos de sensibilidad y especificidad aplicando diferentes condiciones de incubación.<sup>36</sup> y se describe detalladamente en la Tabla 12.



---

## DETERMINACIÓN CONFIRMATORIA

La ventana de detección de drogas de abuso en orina, está limitada a la sensibilidad de los métodos analíticos, en general, el tiempo de detección de un fármaco se incrementa si el análisis se realiza por medio de un metabolito estable, fluido biológico óptimo y utilizando el método más sensible de análisis.

La morfina está presente en la orina como conjugado glucorónido, por lo tanto antes de la extracción, es importante romper el conjugado con hidrólisis ácida o básica. También es posible separar el conjugado mediante el uso de la enzima  $\beta$ -glucoronidasa. La hidrólisis ácida o básica es agresiva debido al tratamiento térmico al que se somete la muestra, por lo tanto, la hidrólisis enzimática es el método más empleado.<sup>62</sup>

Se realizó una revisión de diferentes reportes donde se utilizaron los métodos cromatográficos con diferentes detectores y van acompañados por pre concentración de la muestra y/o etapa de pre tratamiento como hidrólisis enzimática, SPE y la derivatización.<sup>63</sup> Esta revisión se incluyó en la Tabla 13.

La investigación exhaustiva permitió conocer nuevos, relevantes e innovadores métodos basados en la electroforesis capilar para el análisis de drogas de abuso en orina.<sup>64</sup> Siendo cuestión importante de numerosos enfoques de distintos trabajos publicados que se resumen en la Tabla 14.



Kit comercial	Principio del ensayo	Reactivos	Procedimiento general	Cut off (ng/mg)	Selectividad	Cantidad de muestra de orina	Referencia
<b>EMIT II Plus 6-acetylmorphine Assay.</b>  <b>ADVIA® 1800</b> <b>ADVIA® 2400</b>  <b>SIEMENS</b>	Inmunoensayo enzimático multiplicado (EMIT)	1.-Anticuerpos monoclonales de ratón altamente específicos para 6-AM  2.- Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa recombinante	<p><i>Mezcla inicial:</i> 25µL de muestra de orina + 53.3µL reactivo 1 + 26.7µL reactivo 2</p> <p><i>Incubación</i>            *58.4s (ADVIA 1800)            *63.3 (ADVIA 2400)</p> <p>Dilución de muestra 1:5 con solución salina</p> <p>Lectura espectrofotométrica a <math>\lambda = 340</math> a 410 nm</p> <p>Temperatura de ensayo: 37.8 °C</p> <p>Tiempo de primer resultado: 10 min</p>	10ng/mL	ADVIA® 1800 = 98%  ADVIA® 2400 = 99%	25 µL	[36]

**Tabla 12 Determinación de opioides en orina por medio de inmunoensayos.**

Elaborado por: Angélica Muñoz Garnica

*Angélica Muñoz Garnica*



Sustancia	Separación y detección	Tratamiento de la muestra	LOD	Cantidad de muestra	ME %	Referencia
Metadona	HPLC – LTQ -MS	Dilución de muestra: H <sub>2</sub> O des ionizada Pre concentración: SPE (1mL Metanol, 1mL H <sub>2</sub> O des ionizada y 1mL buffer (bicarbonato de sodio/ ácido Borico) pH: 9.6 1mL de muestra diluida. Lavado: Buffer: H <sub>2</sub> O (1:1) Elución: ACN:H <sub>2</sub> O (95:5) Evaporación : 30°C Reconstitución. 0.2 mL Buffer : ACN (95:5)	0.1 ng/mL	1mL	SD	[65]
Dextrometorfano					SD	
Heroína	HPLC – LTQ -MS	Dilución de muestra: H <sub>2</sub> O des ionizada Pre concentración: SPE (1mL Metanol, 1mL H <sub>2</sub> O des ionizada y 1mL buffer (bicarbonato de sodio/ ácido Borico) pH: 9.6 1mL de muestra diluida. Lavado: Buffer: H <sub>2</sub> O (1:1) Elución: ACN:H <sub>2</sub> O (95:5) Evaporación : 30°C Reconstitución. 0.2 mL Buffer : ACN (95:5)	1.0 ng/mL	1mL	SD	[65]
Morfina					SD	



Glucoronidos de Morfina	HPLC – LTQ -MS	Dilución de muestra: H <sub>2</sub> O des ionizada Pre concentración: SPE (1mL Metanol, 1mL H <sub>2</sub> O des ionizada y 1mL buffer (bicarbonato de sodio/ ácido Borico) pH: 9.6 1mL de muestra diluida. Lavado: Buffer: H <sub>2</sub> O (1:1) Elución: ACN:H <sub>2</sub> O (95:5) Evaporación : 30°C Reconstitución. 0.2 mL Buffer : ACN (95:5)	50 ng/mL	1mL		[65]
Morfina Codeína	UPLC-MS/MS	Dilución:(1:250)  Condiciones UPLC: 98%Acido fórmico (0.1%) en agua con metanol 2%  MS/MS + ESI	20 ng/mL	60 µL	100 % 98 %	[66]
Buprenorfina etilmorfina, Fentanilo Hidromorfina	UPLC –MS/M	Dilución 1:10 Hidrólisis enzimática  UPLC: 98% Ácido fórmico 2% Acetonitrilo En agua MS/MS + ESI	1 – 10 ng/mL	100 µL	60% 70% 76% 68%	[66]



Codeína Nor codeína Heroína 6-MAM Morfina	UHPLC-MS/MS	<p>Digestión enzimática con <math>\beta</math>.glucoronidasa, Buffer acetato de sodio pH: 5.2. Incubación: 55°C baño María por 1 hora</p> <p>Preconcentración: SPE (Metanol, agua destilada y Buffer de fosfatos pH6 , 1:1:0.5 ) Lavado:H<sub>2</sub>O dest. y buffer de fosfatos Elución ácida: metanol al 10% en acetato de etilo. Elución básica: acetato/ isopropanol/ Hidróxido de amonio 20% Evaporación 40°C Reconstitución con 0.5 mL de H<sub>2</sub>O dest /metanol (70:30)</p>	Codeína: 50 ng/mL Heroína: 50 ng/mL Morfina: 20 ng/mL 6-MAM : 10 ng/mL	1mL	99% 92% 111% 78% 88%	[67]
---	-------------	---	---	-----	----------------------------------	------

**Tabla 13 Determinación de opioides por medio de métodos cromatográficos**

*Elaborado por: Angélica Muñoz Garnica*



Sustancia	Condiciones de CE	Detección	LOD	Tratamiento de la muestra	Referencia
Codeína , Heroína	CZE.  Capilar de sílice fundida 70 cm x 50 cm Reactivo: BGE (butilglicidiléter) 20 mM Acetato de amonio pH 9.0 Voltaje de separación: 22kV Temperatura: 20°C	ESI – MS	0.4 a 1.0 ng/mL	Precipitación de proteínas	[68]
Morfina Diamorfina	CEC- presión asistida  Capilar de base silica monolítica con polímero monolítico. Fase móvil: Acetato de amonio pH: 6.0 + Acetonitrilo Voltaje de separación: 25°C Temperatura: 25°C	ESI – MS	2.0 - 8.0 nmol /L	Centrifugación con metanol a 4500 rpm por 20 min	[69]
Morfina Codeína	MECK  Capilar de sílica fundida 57 cm x 75µm Reactivo: BGE 20 mM, Buffer de Boratos pH: 9.2 + 60 mM SDS + 5% V/V metanol Voltaje de separación: -25kV Temperatura: 20°C	UV detección a 212 nm	30 – 90 ng/mL	Centrifugación a 5000 rpm por 5 min	[70]

**Tabla 14. Determinación de opioides en orina por medio de electroforesis capilar**

Elaborado por: Angélica Muñoz Garnica

*Angélica Muñoz Garnica*



---

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Dada la relevancia de los resultados de los análisis de drogas de abuso en orina es que se recomienda tomar medidas preventivas para evitar alteración de la muestra, la que puede ser diluida, adulterada o sustituida. La dilución puede ser interna o externa, en el primer caso el individuo se hidrata en forma exagerada de tal forma que la orina pierde sus características propias, la dilución externa se puede realizar con agua u otro líquido.<sup>66</sup> Estas recomendaciones son de responsabilidad exclusiva del laboratorio donde se llevan a cabo la respectiva toma de muestras, las cuales deben estar establecidas en los procedimientos de cada establecimiento. Se debe considerar siempre la capacitación y entrenamiento del personal que se dedique a la recolección y toma de muestra.

La importante ventaja de la orina para los test de detección de drogas es que generalmente está disponible en cantidad suficiente, fácil de recoger, las drogas de abuso y sus metabolitos suelen estar presentes en concentraciones relativamente altas por en una amplia ventana de detección.

Éste fluido biológico es fácilmente adulterable con sustancias como; lejía, vinagre, jabón ya que alteran radicalmente el pH; y agua, para diluirla y producir resultados falsamente negativos.<sup>59</sup> Sin embargo, existen pruebas de detección de adulterantes de orina, un ejemplo de ellas es Urine Check 7 comercializada por laboratorios gaamsa, esta prueba se basa en la medición de creatinina, nitrito, glutaraldehído, pH, gravedad específica, almidón y clorocromato de piridinio en la orina antes de realizar la prueba confirmatoria. Las tiras Urine CHECK 7 son solamente para uso de profesionales de medicina forense y toxicología. Son un dispositivo de prueba selectiva con determinación cualitativa visual.



## CABELLO

---

El cabello es un tejido complejo y anejo de la piel. Se origina en el folículo piloso en cuyo centro germinativo existen células madre que se encuentran en proliferación activa. El tallo del pelo tiene células queratinizadas en diferentes capas que se diferencian en cutícula y médula. La superficie del cabello es hidrofóbica y en el interior es higroscópico.<sup>71</sup> El cabello está compuesto por proteínas (65 – 95%, queratina, esencialmente), agua (15 a 35 %), lípidos (9.1%) y minerales (<1%).<sup>72</sup>

El análisis de cabello para la detección de drogas de abuso ha sido un tema de interés progresivo desde una perspectiva clínica, social y forense, debido a la amplia ventana de detección después de tiempo de ingesta en comparación con los análisis de orina y sangre.<sup>73</sup>

Los parámetros que influyen en el transporte de las drogas en el cabello son: tamaño y estructura molecular, micro entorno (gradiente de concentración, pH), flujo sanguíneo, unión a proteínas plasmáticas y tisulares, liposolubilidad de la droga, coeficiente de forma ionizada/no ionizada, presencia de enzimas en el folículo piloso como: alcoholhidrogenasas, aldehidodeshidrogenasas, carboxilasas, esterasas D, Citocromo P450 , Glutación reductasa, transferasa, S-epóxido transferasa; y los factores que influyen en la incorporación de drogas al cabello es la afinidad de la droga por la melanina, así como la lipofilia y alcalinidad de la droga.<sup>74</sup>

Los mecanismos de incorporación de drogas son: difusión pasiva, excreción de sudor y cebo. Externamente, las drogas pueden ser depositadas por medio de humo, contaminación ambiental o contacto físico, y productos químicos. Dando resultados falsos positivos.



La Sociedad de las pruebas de cabello (Society of Hair Testing, SoHT), ha establecido valores de corte, a partir de los cuales el resultado debe considerarse positivo para las diferentes drogas de abuso, para opiáceos se considera positiva a partir de 0.2 ng/mg en análisis presuntivo y confirmatorio. Además, debe diferenciarse el uso de la heroína con el de codeína o morfina, lo que únicamente se consigue con la identificación de 6-AM. <sup>75</sup>

El análisis del cabello implica al menos cinco pasos:

1. Descontaminación
2. Preparación del cabello: pulverización, segmentación.
3. Incubación: en metanol, NaOH
4. Extracción líquido / líquido, extracción en fase sólida, micro extracción.
5. Análisis: inmunoensayos o cromatografía de líquidos o de gases.

## RECOMENDACIONES DE LA SoHT

La SoHT, tras diversas reuniones con diferentes laboratorios, ha llegado a un consenso para establecer guías para el análisis de esta matriz biológica con recomendaciones que afectan varios aspectos:

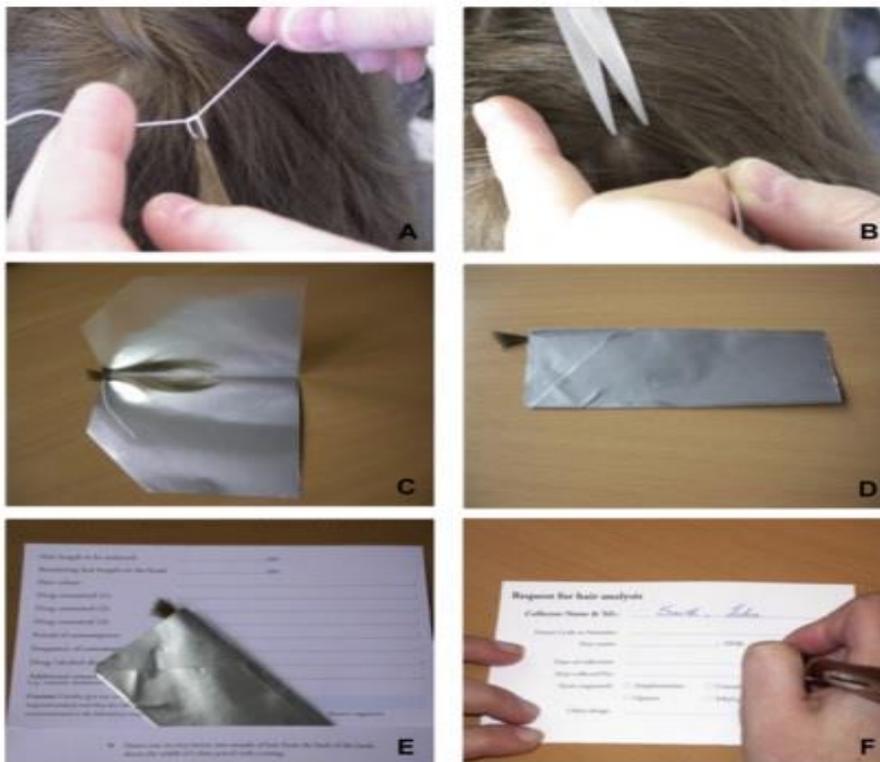
### TOMA DE MUESTRA

Los sitios recomendados para la toma de muestra de cabello por parte de la SoHT es la parte posterior de la cabeza, donde el cabello tiene menos variabilidad en crecimiento. La muestra debe ser atada a un hilo lo más cercano posible al cuero cabelludo, antes de ser cortado. El tamaño de la muestra depende de la finalidad del análisis, por lo general entre 20 a 200 mg de pelo son suficientes para la detección y confirmación de drogas. Una vez cortado, los mechones de cabello deben ser envueltos en papel aluminio y separados, colocando el extremo de la raíz expuesta más cubierto. Cada papel aluminio se dobla una o dos veces y posteriormente se almacena en sobres de papel a temperatura ambiente y en lugar



oscuro y seco. En caso de post- mortem, el pelo debe ser recogido antes de empezar un procedimiento de autopsia, a fin de evitar posible contaminación por otras muestras biológicas. Este procedimiento trata de evitar la desalineación de la muestra y permitir la fácil identificación del extremo de la raíz, que es importante para el análisis.<sup>73</sup> Este procedimiento se ilustra en la Figura 11.

Se recomiendan evitar el almacenamiento en bolsas o tubos de plástico debido al riesgo de contaminación por suavizantes y absorción, ya que el plástico puede extraer sustancias lipofílicas del cabello y debido al riesgo de ruptura de tubos de plástico durante el transporte o maniobras de almacenamiento.



**Figura 13 Procedimiento de toma de muestra de cabello**

*Fuente: Baciú T, Borrull F. et al Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. 2015*



---

## PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La preparación de la muestra se aplica para eliminar cualquier posible contaminación externa, mejorar el rendimiento analítico. Por lo que se debe eliminar el sudor, sebo, polvo así como productos para el cuidado del cabello antes de realizar cualquier análisis en la muestra.<sup>71, 72</sup>

Un paso determinante para la preparación y pre concentración de la muestra es la correcta elección método de análisis. En la literatura se encuentran diferentes métodos de preparación de muestra. La elección del tratamiento depende de las propiedades químicas de los analitos. Entre los que destacan por su versatilidad, se muestran a continuación:

### *i) Descontaminación.*

Este procedimiento puede llevarse a cabo en minutos a horas, el número de pasos de limpieza depende de la sospecha de contaminación. Incluye solventes orgánicos, tampones acuosos, agua, jabón o su combinación.<sup>73</sup> Su propósito es eliminar las impurezas externas tanto sea posible, pero sin necesidad de extraer las drogas de la matriz del pelo. No hay un consenso sobre el mejor lavado. En la revisión se encontraron diferentes procedimientos de cada laboratorio.

### *ii) Extracción/Digestión*

Liberar los analitos unidos dentro de la matriz del pelo es comúnmente alcanzado ya sea por digestión ácida o alcalina, extracción con disolventes, hidrólisis enzimática o incubación con diversos sistemas de tampón. Estos generalmente involucran temperaturas elevadas y largos periodos de incubación, por lo general de 16 a 20 horas.<sup>73</sup>



### iii) Limpieza y pre concentración.

Después de los procedimientos de extracción, las etapas de pretratamiento de las muestra se llevan a cabo normalmente antes del análisis instrumental con el fin de limpiar el extracto de cabello, así como para pre concentrar los analitos. En general, los procedimientos aplicados más comunes incluyen las técnicas de Extracción Líquido-Líquido (LLE), la Extracción en Fase Sólida (SPE).<sup>73</sup>

Estas técnicas pueden estar acopladas a detección de espectrometría de masas por ionización en electrospray (ESI). Sin embargo, se han desarrollado metodologías miniturizadas que son la tendencia actual en la etapa de limpieza, ya que se consideran técnicas “amigables con el medio ambiente”, ya que implican la reducción de volúmenes de disolventes orgánicos con mínima producción de residuos menos tóxicos. Entre ellas se encuentra la micro extracción en fase sólida (SPME).

## DETERMINACIÓN PRESUNTIVA

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas , ELISA, es una prueba heterogénea que permite a la matriz ser lavada antes de una generación de reacción antígeno anticuerpo donde se genera un compuesto colorido, lo que hace que estos ensayos sean extremadamente sensibles.<sup>76</sup> Varios artículos han citado la utilización de ELISA para muestras de cabello. La mayoría de los reportes requieren menos de 50 mg de cabello e incubación con solvente orgánico por toda la noche.<sup>51</sup> En la Tabla 15 se describe el tratamiento, condiciones y parámetros reportados en tres diferentes trabajos.

## DETERMINACION CONFIRMATORIA

Los dos grandes retos en el análisis cualitativo y cuantitativo de drogas de abuso en el cabello son la cantidad limitada de muestra y la baja concentración en una amplia ventana de detección. Para superar estas limitaciones, en la literatura se



propone un método de análisis de Cromatografía líquida-electrospray acoplada a espectrometría en masas en tándem, que permite el análisis simultáneo de drogas de abuso, entre ellos 5 opiáceos.<sup>77</sup> Éste método se aplica habitualmente a muestras de cabello, obteniendo resultados confiables, reproducibles y con alta sensibilidad.

En un reporte donde se utilizó de GC-EI/MS, para la determinación de 14 drogas de abuso donde se incluyen opioides, se llevó a cabo una derivatización en dos etapas, se empleó: N-metil-bis-trifluoroacetamida (MBTFA) y N-metil-(trimetilsilil)- trifluoroacetamida (MMSTFA) con trimetil clorosilano (TMCL) al 1% como reactivos de derivatización, obteniendo como límite de cuantificación (LOQ)  $200\text{pg mg}^{-1}$ , usando 50 mg de cabello. Con la excepción de los metabolitos de cocaína, estos valores están dentro de los valores de Cut off de SoHT. Como significado, este método podría conducir falsos negativos para la ingesta de cocaína, que es especialmente significativo si existen implicaciones legales de consumo de esta sustancia<sup>78</sup>.

A pesar de la sencillez instrumental utilizada y los resultados prometedores obtenidos en términos de precisión analítica, el uso de una etapa de derivatización doble compromete al tiempo de análisis y, por lo tanto, el método no es realmente adecuado para el análisis de cabello. Se describen de manera más detallada las condiciones y características de algunos reportes citados de las determinaciones confirmatorias en la Tabla 16.



Sustancia	Inmunoensayo	Tratamiento de la muestra	Límite de Detección (pg/mg)	Cantidad de muestra de cabello	Sensibilidad y Especificidad	Referencia
Morfina (6-AM)	ELISA	Lavado con metanol (1 mL: 1 min) y acetona (1mL: 1min) . Secado Extracción con buffer pH= 4.5 Incubación por 2 horas a 75°C Neutralización con buffer para dicho fin	200 pg/mg	10 mg	SD	[76]
Opioides	ELISA (Lucio® - Direct ELISA kit)	Lavado con metanol (2mL, 10 min), Secado Extracción con buffer a pH=4.5, 0.5 mL. Incubación 2 horas en baño ultrasonido a 75°C	0.01 – 114.5 pg/mg	10 mg	Sensibilidad: 94% Especificidad: 74%	79
Opioides	ELISA DRI® Test	Aprox 1 mg de muestra se transfirió a tubo de vidrio. 100 µL de solución de lavado de kit Descartar solución de lavado. Se trasvaso muestra a columna keratinizada con aprox 940 µL de solución Se añadió 400 µL de reactivo Digestión 1h a 100°C Mezclado por 20 a 30 min Enfriado	0.05 – 11.9 pg/mg	33 mg	Sensibilidad: 94% Especificidad: 73%	79

SD : Sin Dato

**Tabla 15. Determinación de opioides en cabello por medio de Inmunoensayos**

Elaborado: Angélica Muñoz Garnica

*Angélica Muñoz Garnica*



Sustancia	Separación y detección	Tratamiento de la muestra	Límite de Detección	Cantidad de muestra de cabello	Referencia
Morfina, 6-AM, Codeína	HPLC- DAD	Lavado con Tween 80 al 0.1%, agua. MAE con Metanol (9min, 60°C)	200 pg/mg	50 mg	80
Morfina, 6- MA	UHPLC – ESI-MS/MS	Lavado con Diclorometano (DCM) por 2mL por 3 min, por duplicado. Extracción con metanol (15 horas, 55°C)	6 a 27 pg/mg	50 mg	81
Opioides	LC-ESI-MS/MS	Lavado: Metanol, agua, Metanol Extracción con Metanol (toda la noche)	0.5 a 2.5 pg/mg	10 mg	82
Heroína, 6-MA, Codeína, entre otras DOF	LC-ESI-MS/MS	Lavado con DCM (3mL / 10 min 3veces.) Pulverización y extracción (30 min)	30 pg/mg	50 mg	83
28 Opioides	LC-MS/MS	Lavado con 10mL de agua por 2 min, 10 mL de DCM por 1 min, 3mL de buffer de fosfatos pH= 5 , 18 horas 45°C. Extracción por SPE, condiciones 2mL metanol y 3mL buffer fosfatos pH= 5	0.005 a 0.030 ng/mg	50 mg	77
Opiáceos	UPLC-MS/ MS	Lavado Metanol: Acetonitrilo: Formiato de amonio (pH =5.3) por 18 horas	LOD: 0.002 LOQ: 0.010 ng/mL	10 mg	84
Opioides y opiáceos	UHLC-MS/MS	Lavado: DCM y agua, 2min por sonicación SPE, 2.5 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M pH= 4 y metanol	LOQ: 0.006 - 0.063 ng/mg	20 mg	85
Morfina, Codeína, 6-acetil codeína.	GC-EI/MS	Lavado con DCM (2ml, 5 min) Extracción con Metanol/TFA (toda la noche, 25°C)	30 – 80 pg/mg	25 mg	86

*Angélica Muñoz Garnica*



		SPE Derivatización con MSTFA (30 min, 70°C)			
Codeína, Heroína, 6- acetil morfina, Morfina, 6- acetil codeína	GC-EI/MS	Lavado con agua, benceno, DCM. Digestión por ultrasonificación (toda la noche, 65°C) SPE Derivatización con MSTFA + TMS 5% (25 min, 80°C)	50 pg/mg	20 mg	87
Codeína, Morfina, 6 acetil morfina, oxicodona, oximorfona, hidromorfona	GC – EI/ MS	Lavado con DCM Extracción con Metanol (toda la noche, 56°C) SPE Derivatización con MSTFA SPME	130 – 200 pg/mg	10 mg	88
Codeína, Morfina, 6 acetil morfina	GC-EI/MS	Lavado con jabón diluido con solución fisiológica SPE (fase reversa) Derivatización con BSTFA (20 min, 100°C)	LOQ: 40 – 50 pg/mg	50 mg	89
Codeína, Morfina, 6 acetil – morfina	GC- EI /MS	Extracción con Metanol (toda la noche, 56°C) Derivatización con BSTFA SPME	2 – 5 pg/mg	10 mg	90

**Tabla 16. Determinación de opioides en cabello por medio de métodos cromatográficos**

*Elaborado: Angélica Muñoz Garnica*

*Angélica Muñoz Garnica*



---

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MATRIZ

Las ventajas de esta matriz son numerosas, en las que se incluyen en no ser invasiva, facilidad de recolección que se puede hacer bajo la estrecha supervisión de agentes legales para prevenir la adulteración o sustitución, no necesita condiciones especiales de almacenamiento, la capacidad para detectar el consumo de drogas en el pasado es una característica única de esta matriz, ya que proporciona a los investigadores una ventana de detección amplia, en meses a años.<sup>31</sup>

El análisis de esta muestra biológica, que ha comenzado a utilizarse de forma extensiva en las últimas décadas, no está exento de limitaciones que han de tomarse en cuenta. Todavía falta la total comprensión de los mecanismos de acumulación de las drogas en el cabello y la estandarización de los métodos analíticos necesarios, así como la correcta interpretación de resultados.<sup>73, 72</sup>

Una de las principales desventajas surge desde la toma de muestra, si ésta no es adecuada en cuestión de longitud, tamaño de mechón, ubicación de la muestra en la cabeza. La muestra debe estar acompañada de la máxima información posible, incluyendo datos de la historia clínica, propósito de investigación, sospecha de drogas y tiempo de consumo, etc.<sup>73</sup> Además, la alta posibilidad de dar un falso positivo debido a la contaminación externa que siempre existe si el proceso de lavado de la muestra no ha sido suficientemente riguroso.<sup>73</sup>

Se ha demostrado en sucesivas ocasiones que la correlación existente entre dosis consumida y concentración detectada es limitada debido a las diferencias interindividuales y genéticas, que existen en relación con los procesos metabólicos y picos plasmáticos, así como la propia incorporación de drogas en el pelo, su pigmentación y su estado físico. Por todo aquello, se aconseja que cada laboratorio, que utiliza propios métodos analíticos, sea el encargado de realizar estadísticas a entre sus casos.



---

## INTERFERENCIAS DE LA MATRIZ

Existen diversos métodos de contaminación de este tipo de muestra para el análisis de drogas de abuso, mismos que interfieren en el análisis y determinación de estas sustancias, entre los mecanismos de interferencia podemos encontrar.

### *i) Contaminación externa*

El inconveniente más importante del análisis de cabello es la posibilidad de proporcionar falsos positivos, sobre todo en situaciones donde el individuo está expuesto a las drogas y no las consume activamente. Por otra parte, el manejo de droga en polvo y frotarse el cabello con las manos es otra fuente de contaminación pasiva.<sup>73</sup>

Actualmente, los laboratorios utilizan dos procedimientos complementarios para minimizar la contaminación pasiva:

- Descontaminación de muestra por medio de lavado antes del análisis
- Detección de metabolitos de las drogas.

Varios procedimientos de descontaminación de la muestra se describen en la literatura, pero no hay un acuerdo sobre cual se debe utilizar. Por lo que es un procedimiento intra laboratorio. Desafortunadamente no se logra la eliminación de la totalidad del fármaco depositado externamente incluso después de los procedimientos de lavado.<sup>80</sup>

En general, cuando se detectan las drogas en el cabello y no en el residuo de lavado, el consumo de drogas está indicado, mientras que, cuando los niveles detectados en los residuos de lavado son mayores que en la muestra, es probable la indicación de una contaminación pasiva.<sup>73</sup>



---

## *ii) Influencia de los tratamientos cosméticos.*

Un problema relacionado con el análisis de cabello que no debe pasarse por alto es el posible efecto de diversos productos para el cabello y los tratamientos químicos, blanqueamiento, coloración, permanentes; sobre la medición de las drogas de abuso en el cabello.<sup>73</sup> Ya que estos procesos dañan el cabello mediante la alteración de su porosidad y aumenta la accesibilidad a contaminación externa. La porosidad también puede ser causada por la diferencia racial o mala conservación del cabello.<sup>91</sup> El lavado con shampoo de cabello tiene poco efecto sobre la eliminación de DOA que ya están incorporados en el cabello.

Se han descrito en la literatura diversos estudios donde se relaciona la influencia de diferentes tratamientos en el cabello, por ejemplo, los resultados que corresponden a la decoloración que reportan diferentes autores, las concentraciones disminuyen en el cabello blanqueado (decolorado) en comparación del cabello no tratado; así mismo este tratamiento afecta la estabilidad de determinadas sustancias, por lo tanto disminuyen las concentraciones de opiáceos, por ejemplo, en el cabello.

## *iii) Influencia del color de cabello*

Ésta es otra característica importante a tomar en cuenta en la evaluación de DOA en cabello.

Se ha demostrado que las DOA se unen a la melanina, por lo tanto, entre más oscuro el cabello, mayor contenido de incorporación y unión de DOA. Conforme a la literatura, los fármacos básicos se unen con alta afinidad a eumelanina (cabellos oscuros).<sup>73</sup>



---

#### *iv) Relación dosis – concentración*

Una de las principales cuestiones al interpretar los diferentes resultados es si la cantidad cuantificada tiene relación con la dosis administrada.

Algunos estudios reportan dicha relación como demasiado débil. Entre los estudios observados, se demuestra que no existe una correlación entre la dosis de heroína administrada y la concentración de opiáceos en el cabello. Sin embargo, se relaciona íntimamente con la vida media plasmática.<sup>73</sup>



## SALIVA

---

En el ser humano las glándulas salivales producen alrededor de 1 litro de saliva diariamente. La saliva cumple diversas funciones: lubricar alimento para facilitar su masticación y deglución. Respecto a la composición proteica las dos proteínas fundamentales que están presentes en la saliva son amilasa y mucina que intervienen en la digestión del almidón y en la viscosidad, respectivamente, posee inmunoglobulinas, de composición parecida a la del plasma, contiene agua, iones, mucina, proteínas plasmáticas, leucocitos y detritos celulares.<sup>92</sup>

La saliva contiene menos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y más  $\text{K}^+$  y más  $\text{HCO}_3^-$  que en el plasma, debido a que el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  se reabsorben y los iones  $\text{K}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  se secretan. La composición electrolítica de la saliva depende de la velocidad de secreción, ya que cuanto menor es la velocidad de secreción mayor tiempo tiene el epitelio para modificar y, por lo tanto, reducir la osmolaridad de la secreción.<sup>14</sup>

El uso de fluido oral, saliva, con fines de diagnóstico de enfermedades, vigilar exposición a productos químicos, control de uso terapéutico de algunos fármacos y detectar el uso reciente de drogas ilícitas, cada vez es mayor y ha tenido éxito en la investigación.<sup>93</sup> La saliva contiene analitos en concentraciones 1000 veces menores que en sangre, por lo que se necesitan detectores ultra sensibles bien conocidos para utilizar a la saliva como medio de determinación y diagnóstico. Por lo general, el análisis para la determinación en saliva se realiza a la par con el de sangre.

Varias vías, tanto intra y extracelulares, permiten a las moléculas a ser transportadas de la sangre a la saliva. Ya sea por difusión pasiva de moléculas lipofílicas o transporte activo de proteínas a través de unión ligando receptor.<sup>73</sup> Las drogas se incorporan a la saliva por difusión pasiva que depende de las propiedades del compuesto, principalmente del pKa, de la unión a proteínas, liposolubilidad de la sustancia, peso molecular, carga y tamaño.<sup>94</sup>

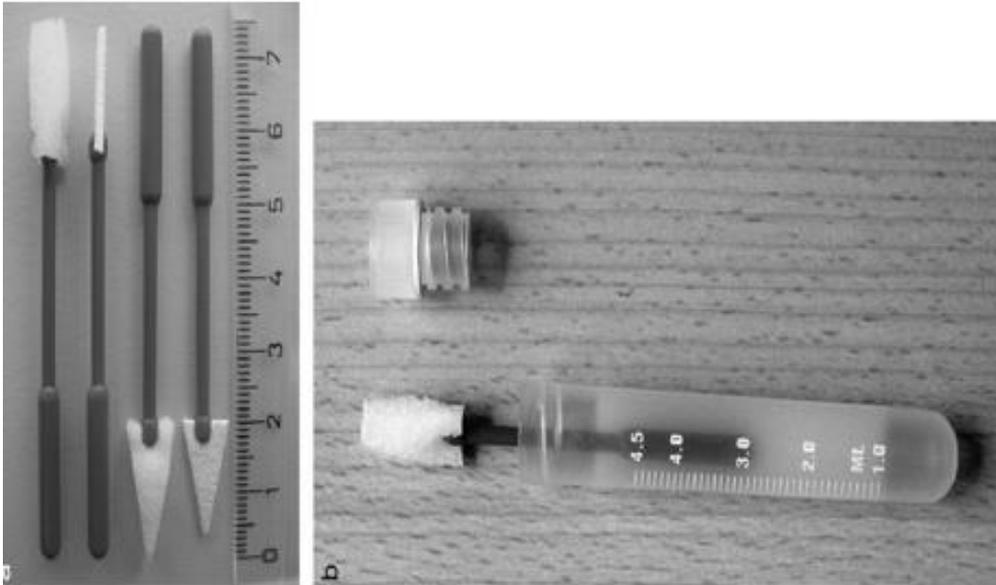


SAMHSA recomienda concentraciones de corte para la determinación en saliva de Morfina y Codeína de 40  $\mu\text{g/L}$ , 6- acetil morfina de 4 $\mu\text{g/L}$  para las técnicas cromatográficas.<sup>95</sup>

## TOMA DE MUESTRA

La toma de muestra de saliva puede ser recogida en virtud de estímulos, la boca en reposo por método de drenaje de babeo, escupir o por medio de un hisopo y método de aspiración. La saliva es estimulada al dar al paciente masticar un trozo de parafina y/o con la aplicación de una gota de ácido cítrico en la lengua.<sup>94</sup> En la actualidad, hay empresas que comercializan kits de dispositivos de toma de muestra salival.

Uno de los dispositivos más utilizado es BD Visispear, se ilustra en la Figura 12, que se vende como el dispositivo de recolección de saliva comercializado por Salimetrics, tiene una longitud total de 7 cm y consta de un eje de plástico de 5.5 cm de longitud, diámetro de +/- 3 mm, con 1.7 cm de longitud y 1mm de espesor de material absorbente de esponja. La toma de muestra de saliva con la esponja se realiza sujetando el eje plástico y la introducción de la esponja en la boca. La esponja se puede colocar por debajo de la lengua y con movimientos suaves en la boca. Este proceso dura aproximadamente 1 minuto (dependiendo de la saliva presente) y es fiable, ya que la esponja se hincha visiblemente y garantiza la toma de muestra en cantidad suficiente, 200 a 250  $\mu\text{L}$  de saliva. Para su almacenamiento y su tratamiento posterior, el dispositivo se coloca con la esponja en un tubo de polipropileno de 5 mL con tapón de rosca y se almacena a  $-18^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ .<sup>96</sup>



**Figura 14** Dispositivo BD Visispear para la recolección de muestras salivales.

*Fuente: de Weerth C, Jansen J, et al. A new of collection saliva for cortisol determination. 2007*

## PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En la literatura se reportan diferentes métodos de preparación de la muestra, con el fin de eliminar interferencias de la matriz. Algunas de las preparaciones constan de un procedimiento de precipitación de proteínas con acetonitrilo y evaporación con nitrógeno y extracción en fase sólida con solventes orgánicos.<sup>97</sup>

## DETERMINACIÓN PRESUNTIVA

Cozart® EIA, ELISA, es frecuentemente utilizado en laboratorios de análisis forenses para la determinación de drogas de abuso en sangre y saliva. En términos de sensibilidad y especificidad es excelente ELISA, por lo tanto es una técnica apropiada para la determinación de drogas de abuso.<sup>98</sup> Como se muestra en la Tabla 17, para llevar a cabo el análisis de saliva por medio de ELISA, es importante el pre tratamiento de la muestra, donde se utiliza de manera rutinaria



SPE con metanol y lavados con agua des ionizada. En término de sensibilidad y especificidad es una técnica apropiada para resultados presuntivos.

## DETERMINACIÓN CONFIRMATORIA

Como se muestra en la Tabla 18, en la literatura se reportan determinaciones por LC de distintas sustancias de abuso en fluido oral, los principales analitos detectados fueron 6 – AM, heroína y morfina con una sensibilidad por arriba del 84%. La papaverina no es posible detectar en el fluido oral, y podría deberse a la perdida de adsorción con el dispositivo de toma de muestra.

En un estudio, se realiza una comparación con muestras de orina y saliva, se observa una sensibilidad, confiabilidad y reproducibilidad fiables, lo que indica que la prueba de fluido oral, saliva, es apropiada para detectar opioides.<sup>73</sup> Adicionalmente, mediante la utilización de un método más sensible como lo es LC-APCI.MS/MS, con límite de cuantificación de  $1\mu\text{g/L}$  ha sido posible cuantificar codeína, norcodeína, normorfina, noscapina y acetil codeína en muestras.<sup>94</sup>

Con reportes similares se utiliza como técnica de tratamiento de muestra SPE y confirmatoria LC-MS, donde los límites de detección obtenidos varió entre 0.22 a 1.07 ng/mL, esta variación se atribuye al peso molecular, carácter apolar. Éste método es apropiado para la cuantificación de morfina y codeína por medio de una toma de muestra de escupir.<sup>97</sup>



**Tabla 17. Determinación de opioides en saliva por medio de inmunoensayos.**

Sustancia	Inmunoensayo	Tratamiento de la muestra	Cantidad de muestra	Sensibilidad y Especificidad	Referencia
Morfina, 6-AM	<p>ELISA Cozart microplate EIA</p> <p>Marcador: Peroxidasa de rábano picante</p>	<p>SPE: Columna acondicionada con 1 mL de metanol y 1 mL de buffer de fosfatos pH : 6.0 Lavado con agua desionizada.</p> <p>Elución: 1mL diclorometano: 2 propanol (80:20) Temperatura de secado: 40°C Reconstitución con BSTFA y TMS</p> <p>INMUNOENSAYO: 25 µL de muestra a posillo de la microplaca, seguido por el conjugado enzimático.</p> <p>Incubación de 30 min</p> <p>Lavado: con buffer de lavado</p> <p>Sustrato 3.3', 5, 5'tetrametil bencidina como cromógeno.</p> <p>Lectura de absorbancia a λ: 450 nm</p> <p>Concentraciones por medio de curva de calibración</p>	25 µL	<p>Sensibilidad: 99.1%</p> <p>Especificidad: 94.4 %</p>	98



**Tabla 18. Determinación de opioides en saliva por medio de métodos cromatográficos.**

Sustancia	Separación y detección	Tratamiento de la muestra	Límite de cuantificación	Cantidad de muestra	ME%	Referencia
Heroína Morfina 6-Acetil morfina	LC-MS/MS	Precipitación con Acetonitrilo y evaporación con Nitrógeno.  100 µL FASE MÓVIL: A: Formiato de amonio 10 mM en agua B: Ácido fórmico 0.001% y acetonitrilo  Determinación por HPLC  Temperatura de horno: 25°C	1µg/L	200 µL	No evaluado	99
Morfina y codeína	LC-MS/MS	SPE 3mL de buffer de fosfatos pH: 6 50µL de solución metanólica  LC: metanol /agua MS – MS: la ionización por electro spray operado en modo de ion positivo,  Temperatura: 145 – 395°C Voltaje: 3000 V	0.3 µg/L	200 µL	103.3% 106.2%	97



		La morfina y codeína no se fragmentaron por la gran pérdida de sensibilidad al realiza RMN				
Morfina, 6 AM	GC- MS	Columnas acondicionadas con metanol y buffer de fosfatos. Lavado con agua des ionizada y metanol .  Derivatización con BSTFA y TMS 70°C por 20 minutos	20 ng/mL	25 µL	No se evalua	98



---

## INTERFERENCIAS DE LA MATRIZ

Las interferencias potenciales también fueron estudiadas en el reporte de Cooper, donde afectan la idoneidad de la muestra y las concentraciones de las drogas de abuso y se refieren a sustancias cotidianas, alcohol, dulces, goma de mascar, café, té, jugo de naranja, agua ,enjuague bucal y tabaquismo, sin embargo no afectaron potencialmente las características propias de la matriz.<sup>31</sup>

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Las ventajas que supone la determinación de drogas en saliva es que se trata de una recolección no invasiva y fácilmente obtenible, no requiere autorización judicial, difícil de adulterar, permite la determinación de fracciones libres de las drogas, estableciendo buena correlación con los niveles plasmáticos y se asocia a consumo reciente de estas sustancias.<sup>99</sup>

Pero como desventaja se pueden mencionar, las variaciones intra e intersujetos de las concentraciones y la influencia de diversos factores en estas concentraciones, algunas sustancias provocan sequedad bucal con disminución de la secreción de saliva, lo que dificultaría la toma de una muestra suficiente, la escasa precisión en el conocimiento de la relación saliva – plasma para todas las sustancias, la composición salival puede ser modificada por el método de toma de muestra y el grado de estimulación de flujo de saliva, riesgo mínimo de infección contratante durante la toma de muestra.<sup>94</sup>



---

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró conocer de manera general las metodologías que se llevan a cabo en distintos laboratorios de investigación, forenses y clínicos, para la determinación de drogas de abuso. De la misma manera, se entendió la importancia de la elección de una matriz biológica ante diferentes situaciones y su tratamiento para una óptima interpretación de resultados. La orina ha sido la matriz biológica preferida para análisis y por lo tanto más utilizada en los laboratorios, es importante tener en cuenta que pueden haber matrices alternativas y tanto la saliva como el cabello son opciones excelentes de análisis.

El cabello se ha convertido en una matriz biológica fundamental y alternativa, para la determinación de drogas de abuso. Sin embargo, es una matriz muy compleja y las concentraciones son menores que en las determinaciones con las matrices antes mencionadas, por lo que existe la necesidad del desarrollo de métodos selectivos y sensibles para el análisis. Un inconveniente importante es la presencia de diversas fuentes de sesgo en la interpretación, que a veces son difícil de manejar y/o eliminar. Una de ellas son las posibles diferencias genéticas que desempeña un papel importante en las concentraciones de melanina y de porosidad del cabello, y como tal, la incorporación de drogas.

Las recientes mejoras en la instrumentación cromatográfica y de detección, permiten una identificación precisa de drogas de abuso, lo cual es útil cuando las implicaciones legales están involucradas. La disponibilidad de metodologías multidroga sensibles puede ayudar a obtener información precisa y detallada acerca de las muestras analizadas, evitando así una errónea interpretación de resultados.

La importancia de la selección de las metodologías, presuntivas y confirmatorias, es una decisión fundamental para la evaluación de matrices biológicas con presencia de drogas de abuso. Por lo tanto, es fundamental la



---

calificación, evaluación y validación de los métodos analíticos y del personal que ejecuta, interpreta y reporta los resultados de estos.

Cómo ya se mencionó, el efecto matriz es considerado un parámetro indispensable a evaluar, ya que este efecto puede aumentar o disminuir las señales de los analitos dentro de una matriz biológica, lo que podría ocasionar falsos positivos como falsos negativos. Es aquí donde podría mejorar la investigación aplicando posibles acciones preventivas para mejorar o eliminar las señales aumentadas o disminuidas por sustancias endógenas de la matriz biológica. Estas mejoras pueden resumirse en: la selección correcta de la matriz biológica, modificar las condiciones cromatográficas y espectrométricas, uso de estándares internos y técnicas de calibración, optimizar los procesos de pre tratamiento y extracción de la muestra. Y con estas propuestas realizar pruebas intra e inter laboratorios e internacionalizar estas condiciones para una correcta interpretación y aplicación en los diferentes campos que la investigación relacione.



---

## PERSPECTIVAS

Con esta revisión bibliográfica se pretende colaborar multidisciplinariamente en diversos campos de investigación, como lo es ciencias forenses, toxicología analítica, medicina legal, peritaje, farmacotepia, genética, entre otros.

Unas de los grandes retos para la determinación de drogas de abuso son la eliminación o supresión del efecto matriz. Por lo que diversos estudios ya lo han considerado como un importante parámetro para la validación de los métodos.

Estos avances puede extrapolarse a algunas aplicaciones clínicas, como lo es el análisis de las muestras biológicas para un estudio genético de polimorfismos en las enzimas del metabolismo de xenobióticos, como lo es CYP3A4 y CYP2D6, y así comprobar los fenotipos de los individuos del tipo de metabolismo que poseen. Es importante este punto genético, ya que gracias a ello podemos descartar o asumir la drogodependencia y/o una intoxicación grave por drogas de abuso con origen genético, de la misma manera, un estudio de prevalencia de polimorfismos en la población mexicana, por lo tanto adecuar un apropiado tratamiento y estudios posteriores.

Desde el punto de vista analítico, este estudio puede colaborar también, como orientación a laboratorios gubernamentales y particulares, donde se realizan pruebas de detección de abuso, sobre parámetros que se deben tomar en cuenta para garantizar la confiabilidad y sus criterios de validación.

Otra opción de aplicación es el monitoreo farmacoterapéutico de opioides, en pacientes con dolor crónico, desintoxicación y tratamiento; para apoyar en la elección de matrices biológicas no invasivas y de fácil recolección; así su adecuado método de análisis.



## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1</b> Principales sustancias de abuso.	7
<b>Tabla 2.</b> <i>Clasificación de las sustancias de abuso, de acuerdo a estatus legal, origen y efectos.</i>	9
<b>Tabla 3.</b> Principales opioides y opiáceos.	14
<b>Tabla 4</b> Efectos funcionales asociados a los principales tipos de receptores opioides.	15
<b>Tabla 5.</b> Indicaciones terapéuticas de los opioides y ejemplo de opioide utilizado.	17
<b>Tabla 6.</b> <i>Vías de administración de los distintos opiáceos.</i>	21
<b>Tabla 7.</b> Enzimas utilizadas como marcadores en los inmunoensayos EMIT.	38
<b>Tabla 8.</b> Características de los kits comerciales para la determinación de opiáceos.	40
<b>Tabla 9</b> Composición de matrices biológicas.	67
<b>Tabla 10</b> Ventana de detección en orina de diferentes opioides	68
<b>Tabla 11</b> Características de Inmunoensayo LUCIO ®- Direct ELISA	43
<b>Tabla 12</b> <i>Determinación de opioides en orina por medio de inmunoensayos.</i>	71
<b>Tabla 13</b> Determinación de opioides por medio de métodos cromatográficos	74
<b>Tabla 14.</b> <i>Determinación de opioides en orina por medio de electroforesis capilar</i>	75
<b>Tabla 15.</b> <i>Determinación de opioides en cabello por medio de Inmunoensayos</i>	83
<b>Tabla 16.</b> <i>Determinación de opioides en cabello por medio de métodos cromatográficos</i>	85
<b>Tabla 17.</b> Determinación de opioides en saliva por medio de inmunoensayos.	94
<b>Tabla 18.</b> Determinación de opioides en saliva por medio de métodos cromatográficos.	95



---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Papaver somniferum	10
<b>Figura 2.</b> Estructura general del opio	11
<b>Figura 3</b> Metabolismo de opioides.	25
<b>Figura 4</b> Procedimiento de toma de muestra de cabello	79
<b>Figura 5</b> Dispositivo BD Visispear para la recolección de muestras salivales.	92
<b>Figura 6</b> Pasos de activación de cartucho de Extracción en fase sólida (SPE)	56
<b>Figura 7</b> Esquema de dispositivo de SPME	58
<b>Figura 8.</b> Esquema de un sistema cromatógrafo de gases.	48
<b>Figura 9.</b> Esquema de un sistema cromatógrafo de líquido.	51



---

## GLOSARIO

**Abuso de fármacos.** Cualquier uso de un fármaco legal o ilegal con el propósito de provocar un detrimento en la salud física o emocional.

**Adicción.** Hábito de conductas peligrosas o de consumo de drogas y del que no se puede prescindir o resulta muy difícil.

**Agonista:** aquella sustancia que es capaz de unirse a un receptor, activarlo y provocar una respuesta bioquímica o celular.

**Agonista parcial:** activa al receptor, pero no causa tanto efecto como un agonista completo y, además, presenta un efecto máximo inferior al del agonista.

**Antagonista:** opuesto a un agonista en el sentido de que mientras un antagonista se une al receptor, no solo lo activa si no que bloquea su activación por agonistas.

**Derivatización:** Proceso que consiste en modificar químicamente un compuesto para producir un derivado con nuevas propiedades que faciliten o permitan su análisis, mejora la volatilidad, sensibilidad (da lugar a disminución de Límites de detección y cuantificación), estabilidad térmica y detección del analito. Los tipos de Derivatización son: Sililación, Acilación, Alquilación.

**Dependencia física.** Estado fisiológico adaptativo que ocurre con el uso continuo de una sustancia y que produce un síndrome de abstinencia cuando ésta se deja de usar. Usualmente ocurre cuando existe tolerancia.

**Efecto de rebote.** Se produce cuando el efecto del fármaco es sólo de unas pocas horas.

**Uso de fármacos.** El término se utiliza para cualquier tipo de administración de fármacos.

**Mal uso de fármacos.** Éste término se utiliza cuando se está utilizando de forma inapropiada un medicamento legalmente formulado para fines terapéuticos. Este



mal uso se puede dar cuando un paciente no siguiendo las instrucciones de la prescripción.

**Estupor.** Estado de inconsciencia parcial con ausencia de movimientos y reacción a los estímulos.

**Estupefaciente.** Sustancia narcótica o analgésica que causa hábito, altera las condiciones fisiológicas y psicológicas de una persona y produce un estado especial de euforia.

**Dependencia psíquica** es la compulsión a tomar sustancia determinada para obtener la vivencia de efectos agradables y placenteros o evitar malestar. Dos de las sustancias que predominantemente producen dependencia psicológica son la cafeína y el chocolate.

**Dependencia física** es un estado de adaptación del organismo producido por la administración repetida de una sustancia. Se manifiesta por la aparición de trastornos físicos o menos intensos cuando se interrumpe la administración de la misma.

**Opiofagia.** Hábito de consumir opio, estrictamente hablando, por vía oral, bien a pequeñas dosis como excitante, o bien a dosis más elevadas como sedante y estupefaciente.

**Reacción aguda.** Reacción tóxica debida a un exceso de dosis, una alteración de la excreción o ambas.

**Receptores opiáceos.** Son los receptores a los que se unen las sustancias opioides endógenas y los opiáceos. La teoría de los receptores de membrana ha cambiado los modelos clásicos de clasificación y, actualmente, se tipifican por la acción, agonista o antagonista, sobre cada uno de ellos.

**Síndrome de abstinencia** es lo que produce tras haber una dependencia física y psíquica, en el momento en el que la droga falta, aparece todo un conjunto de signos y síntomas de carácter físico y psíquico, cuya intensidad y curso temporal



---

van a depender del tipo de droga y otros factores como frecuencia, cantidad y antigüedad del consumo.

**Tintura de láudano.** Tintura alcohólica de opio, preparada por primera vez por el alquimista Paracelso. Es preparado por vino blanco, azafrán, clavo, cane y otras sustancias además del opio. Usada con fines medicinales en una gran variedad de patentadas durante el siglo XIX.

**Tolerancia** es un estado de adaptación caracterizado por la disminución de la respuesta a la misma cantidad de droga, o por la necesidad de una dosis mayor para provocar y sentir el mismo efecto. La tolerancia puede resultar de dos mecanismos diferentes: tolerancia metabólica, estimulando el hígado para que produzca niveles de enzimas que transforman a los compuestos para excretarlos del organismo; la tolerancia por disposición ocurre cuando hay una adaptación de las funciones fisiológicas, como el SNC puede incrementar la producción de neurotransmisores para anular la influencia de alguna droga.

**Uso hedónico.** Tendencia a la búsqueda del placer y el bienestar.



## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Campillo Seva N. *Introducción al análisis químico*. 2011. Universidad de Murcia. [En línea: <http://ocw.um.es/ciencias/analisis-quimico/material-de-clase-1/tema-1.pdf> ]
2. Garber CC, Carey RN. Evaluation of methods. En: Kaplan LA, Pesce AJ, eds. *Clinical chemistry: Theory, analysis, and correlation*. 3ª ed., St. Louis: Mosby; 1996:402-23
3. Becoña IE, VázquezGF. El concepto de droga y drogodependencia. España. 2001. P11-32
4. UNODC, 2015. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el delito.. [En línea] : <http://www.ipu.org/splz-e/unqa16/drug-report-s.pdf> [Último acceso: 06 Enero 2016].
- 5 . DOF, LGS. *Ley General de Salud*. [En línea] [http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/LEY\\_GENERAL\\_DE\\_SALUD.pdf](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/LEY_GENERAL_DE_SALUD.pdf) [Último acceso: 20 Diciembre 2015]
- 6 . Diaz, D. M. V., Murillo Zaragoza, J. R. & Alvarado Hernández , H., 2010. Farmacología de los agonistas y antagonistas de los receptores opioides.. *Educación e Investigación Clínica*, 1(2), pp. 106- 137
- 7 .-Fernández Miranda, J. J. y otros, 2010. Opiáceos. *Guía clínica sociodrogalcohol basadas en la evidencia científica.*, 1(1), pp. 15 - 39.
- 8 . Gálligo, F. C., 2010. Drogas: Conceptos Generales, epidemiología y valoración del consumo. [En línea] Available at: [www.comsegovia.com/pdf/cursos/tallerdrogas/Curso%20Drogodependencias/Drogas,%20conceptos%20generales,%20epidemiologia%20y%20valoracion%20del%20consumo.pdf](http://www.comsegovia.com/pdf/cursos/tallerdrogas/Curso%20Drogodependencias/Drogas,%20conceptos%20generales,%20epidemiologia%20y%20valoracion%20del%20consumo.pdf) [Último acceso: 17 Noviembre 2015].
- 9 . O.D.C, 2016. Observatorio de Drogas de Colombia. [En línea] Available at: <http://www.odc.gov.co/CONSUMO-DE-DROGAS/Sustancias-psicoactivas> [Último acceso: 08 Diciembre 2015].
- 10 . Rang, H. P., 2012. *Farmacología*. 7a ed. Barcelona, España.



- 11 . Romero, D. B., 2006. La adormidera en el mediterráneo oriental: planta sagrada, planta profana., España: Universidad Nacional de Educación a Distancia. Centro Asociado de Las Palmas
- 12 .Moya G., C., González A., J., Sánchez M., A. & Alvares V., C., 2010. Mitos y realidades de la Heroína, Madrid: Ministerio de Sanidad y Política Social. Centro de Publicaciones.
- 13 <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/encefalinasendorfinas.html>
14. Guyton, A. C., 2011. *Tratado de fisiología médica*. 12 edición ed. Barcelona, España: Elsevier.
15. OFFARM Vol 24 Num 2 Febrero 2005 Disponible en línea:  
[http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pident\\_articulo=13071460&pident\\_usuario=0&pcontactid=&pident\\_revista=4&ty=49&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=4v24n01a13071460pdf001.pdf](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13071460&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=4&ty=49&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=4v24n01a13071460pdf001.pdf)
- 16 . Chorro, I. M., 2011. Toxicología Clínica. Madrid: Grupo difusión.
- 17 . Musshoff, F. y otros, 2010. Pharmacogenetics and forensic toxicology. *Forensic Science International* , Volumen 203, pp. 53 - 62.
- 18 . Gashe, Y. y otros, 2004. Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism. *The new england journal of medicine* , 351(27), pp. 2827 - 2831.
- 19 . Rook , E. y otros, 2006. Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites: review of the literature.. *Clinical Pharmacology*, Volumen 1, pp. 109 – 118
20. Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain*. 2006;10: 287–333.
21. Vuilleumier PH, Stamer UM, Landau R. Pharmacogenomic considerations in opioid analgesia. *Pharmgenomics Pers Med*. 2012;5:73–87



- 
- 22 Racoosin JA, Roberson DW, Pacanowski MA, Nielsen DR. New evidence about an old drug—Risk with codeine after adenotonsillectomy. *N Engl J Med*. 2013;368:2155–7.
- 23 Centro de Información y Evaluación de Medicamentos y Productos Sanitarios. Riesgo de intoxicación por codeína en lactantes. *Boletín de Farmacovigilancia de la Región de Murcia*. 2012;25:1–4.
- 24 Nochebuena G. , M. H., Acquardt A. , Z. & Jiménez B. , M. V., 2015. Eventos adversos en pacientes sometidos a anestesia y analgesia neuroaxial.. *Revista CONAMED*, 20 (1), pp. 5 - 11.
- 25 Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA) Informe Europeo sobre Drogas. Tendencias y novedades. 2015. Disponible en línea: [http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att\\_239505\\_ES\\_TDAT15001ESN.pdf](http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_239505_ES_TDAT15001ESN.pdf)
- 26 UNODC, 2014. Informe Mundial sobre Drogas 2014, s.l.: Publicaciones de las Naciones Unidas.
- 27 . CICAD, 2015. Informe sobre Uso de Drogas en las Américas 2015. *Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas*, XIV(6.6), pp. 166 - 178.
- 28 Villatoro Velazquez, J. y otros, 2012. *Instituto Nacional de Salud Publica*. [En línea]  
Available at:  
[http://encuestas.insp.mx/ena/ena2011/ENA2011\\_drogas\\_con\\_anexo.pdf](http://encuestas.insp.mx/ena/ena2011/ENA2011_drogas_con_anexo.pdf)  
[Último acceso: 12 Febrero 2016].
- 29 CONACYT, 2015. Epidemiología del consumo de drogas en México. [En línea]  
Available at: <http://www.conacytprensa.mx/index.php/ciencia/salud/3725-drogadiccion-mexico>  
[Último acceso: 12 Febrero 2016]



- 30 Gutierrez, R. E., 2011. *Guía Práctica del Uso Racional de Analgésicos Opioides*. [En línea]  
[http://www.palia.gob.mx/site/images/recursos\\_electronicos/Guia\\_practica\\_Racional\\_de\\_Analgésicos\\_Opioides\\_Raymundo\\_Escutia\\_2011.pdf](http://www.palia.gob.mx/site/images/recursos_electronicos/Guia_practica_Racional_de_Analgésicos_Opioides_Raymundo_Escutia_2011.pdf)  
[Último acceso: 05 Febrero 2016].
- 31 Moreno, L. R., 2011. *Los indicios biológicos del delito*. Tercera ed. México: Ubijus INACIPE.
- 32 Apuntes de Toxicología, Q.F.B. Clave 1614. Facultad de Química, Departamento de Farmacia, UNAM. 2013. Prof. Francisco Hernández Luis, Coord.
- 33 Pascacio, I. R. V. C., 2007. *Instituto de Biotecnología*. [En línea]  
Available at: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>  
[Último acceso: 10 Enero 2016].
- 34 Pacheco Martínez , N. G., 2010. *Estudio comparativo del inmunoensayo enzimático multiplicado, radioinmunoensayo y quimioluminiscencia como métodos preliminares para detectar drogas de abuso. (Tesina de Licenciatura)*. México DF: s.n.
- 35 Avellaneda H. , G., 2009. *Aseguramiento de la calidad para la detección de metabolitos de drogas de abuso*. México DF, s.n.
- 36 Warren , J. A., Siefrieng, G. & Morjana, N., 2014. Development of application protocols of the Emit II Plus 6-AM assay on the ADVIA 1800 and 2400 Chemistry Systems. *Forensic Science International*, Volumen 244, pp. 12 – 127
- 37 Agius , R., Nadulski, T. & Moore, C., 2012. Validation of LUCIO - Direct ELISA kits for the detection of drugs of abuse in urine: Application to the new German driving licence re-granting. *Forensic Science International*, Volumen 215, pp. 38 - 45.
- 38 Minden, n. v., s.f. *nal von minder*. [En línea]  
Available at: <http://www.nal-vonminder.com/en/laboratory-tests-product-list/cat/elisa-kits-6.html> [Último acceso: 15 Febrero 2016].



39

[http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia\\_de\\_gases.pdf](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf) [Consultado: 05 Diciembre 2015]

40 Villa, G. P., 2003. *Instituto de biotecnología*. [En línea]:

[http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec\\_Masas.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec_Masas.pdf) [Último acceso: 5 Enero 2016].

41 Recurso en línea :

[http://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/1-Nuevas%20tendencias%20en%20Extraccion%20en%20Fase%20Solida%20\(SPE\)-8%20Marzo%20Almiral%20version%202.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/1-Nuevas%20tendencias%20en%20Extraccion%20en%20Fase%20Solida%20(SPE)-8%20Marzo%20Almiral%20version%202.pdf) [Último acceso: 05 Diciembre 2015]

42 Gambelunghe, C., Rossi, R., Ferranti, C. & Bacci, M., 2005. Hair analysis by GC/MS/MS to verify abuse of drugs. *Journal Appl. Toxicology*, Volumen 25, pp. 205 - 211.

43 Wada, M., Ikeda, R., Kuroda, N. & Nakashima, K., 2010. Analytical methods for abused drugs in hair and their applications. *Analytical Bioanalytical Chem.*, Volumen 397, pp. 1039 - 1067.

44 Recurso en línea:

[http://www.waters.com/waters/es\\_MX/HPLC/nav.htm?cid=514251&locale=es\\_MX](http://www.waters.com/waters/es_MX/HPLC/nav.htm?cid=514251&locale=es_MX) [Último acceso: 5 enero 2016]

45 Recurso en línea:

<http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf> [Último acceso: 5 enero 2016]

46 Recurso en línea :

[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/5.5Cromatografiadeliquidos\\_7806.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/5.5Cromatografiadeliquidos_7806.pdf) [último acceso: 5 enero 2016]

47 Pfaffe, T. y otros, 2011. Diagnostic potencial of saliva: current state and future applications. *Clinical Chemistry*, 57(5), pp. 675 - 687.



- 48 Morales Becerril Illán. “Electroforesis”. Facultad de Química. UNAM.  
Disponible es  
línea:[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Exposicion\\_electroforesis\\_5087.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Exposicion_electroforesis_5087.pdf) última vez revisado: 12 Febrero 2016.
- 49 . Pontífica Universidad Javeriana (2008) Electroforesis en  
<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/electroforesis.html>
- 50 Recurso en línea: <http://www.teknokroma.es/UserFiles/Filtracion/682.pdf>
- 51 Serrano, G., 2016. *Sigma - Aldrich*. [En línea]  
Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/video/analytical/microextraccion-en-fase-solida-spme.html> [Último acceso: 21 Enero 2016].
- 52 Pérez, L. P. O., 2004. *Instituto de Biotecnología*. [En línea] Available at:  
[http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia\\_de\\_gases.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_gases.pdf) [Último acceso: 5 Enero 2016]
- 53 Páez Rodríguez, J., 2010. *Confirmación de drogas de abuso por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de muestras presuntamente positivas (Tesina de Licenciatura)*. México DF: s.n.
- 54 SEQC, 2011. *QEQC*. [En línea]  
<http://www.seqc.es/dl.asp?175.145.205.255.15.30.27.21.118.133.24.113.255.173.47.4.166.145.65.156.249.7.59.163.200.31.247.103.97.90.89.66.33.139.222.23.10.135.250.109.230.94.228.219.132.242.15.70.245.131.93.194.187>  
[Último acceso: 15 Noviembre 2015].
- 55 Nic , M. J., Jirat, J. & Kosata , B., 2014. *IUPAC goldbook*. [En línea]  
Available at: <http://goldbook.iupac.org/M03759.html> [Último acceso: 18 Febrero 2016].
- 56 Wang, Y. et al., 2016. Study of matrix effects for liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of 4 aminoglycosides residues in milk. *Journal of Chromatography A*, 1437, pp.8–14. Available at:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731630067X>.
- 57 Gosetti, F., Mazzuco, E., Zampieri, D. & Gennaro , M. C., 2010. Signal suppression/enhancement in high performance liquid chromatography tandem



- mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, Volumen 1217, pp. 3929 - 3937.
- 58 Periat, A. et al., 2015. Systematic evaluation of matrix effects in hydrophilic interaction chromatography versus reversed phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1439, pp.42–53. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.035>.
- 59 .- Virkler, K. & Lednev, I. K., 2009. Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non- destructive rapid confirmatory identification at crime scene.. *Forensic Science International*, Volumen 188, pp. 1 - 17.
- 60 Wolff, K. & Farrel, M., 2011. *Revista de Toxicomanías. RET*. [En línea] Available at: [http://www.cat-barcelona.com/uploads/rets/RET28\\_1.pdf](http://www.cat-barcelona.com/uploads/rets/RET28_1.pdf) [Último acceso: 05 Enero 2016].
- 61 SAMHSA., 2008. Substance Abuse Mental Health Services Administration Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs. *Substance Abuse Mental Health Services Administration*, 73(228), pp. 71858 - 71907.
- 62 Dasgupta , A. & Wahed, A., 2014. Drugs of Abuse Testing. En: doi:10.1016/B978-0-12-407821-5.00016-4, ed. *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*. s.l.:Elsevier, pp. 289 - 306.
- 63 Guo, H. y otros, 2015. Sensitive detection of anioic metabolites of drugs by positive ion mode HPLC . PIESI - MS. *International Journal of Mass Spectrometry*, Volumen 389, pp. 14 - 25.
- 64 Baciú , T. y otros, 2015. Capillary electrophoresis and related rechniques in the determination od drugs of abuse and their metabolites.. *Trends in Analytical Chemistry* , Volumen 74, pp. 89 - 108.
- 65 .-Li, X. y otros, 2013. Rapid screening of drugs of abuse in human urine by high-performance liquid chromatography couple with high resolution and high mass accuracy hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Volumen 1304, pp. 96 - 104.



- 
- 66 Hegstad , S. y otros, 2014. Screening and quantitative determination of drugs of abuse in diluted urine by UPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, Volumen 947, pp. 83 -95.
- 67 Tang, M. y otros, 2014. Simultaneous detection of 93 conventional and emerging drugs of abuse and their metabolites in urine by UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, Volumen 969, pp. 272 - 284.
- 68 Lu. , M. y otros, 2011. Determination of stimulants and narcotics as well as their in vitro metabolites by online CE- ESI- MS. *Electrophoresis* , Volumen 32, pp. 472 - 478.
- 69 Lu , M. y otros, 2008. Pressure assisted capillary electrochromatography with electrospray ionization mass spectrometry based on silica based monolithic column for rapid analysis of narcotics.. *Electrophoresis* , Volumen 29, pp. 936 - 943.
- 70 Rodríguez , J., Castañeda , G., Contento , A. & Muñoz , L., 2012 . Direct and fast determination of paclitaxel, morfine and codeine in urine by micelar electrokinetic chromatography. *Journal Chromatography A*, Volumen 1231, pp. 66 - 72 .
- 71 Kintz, P., 2013. Drugs in Hair. *Encyclopedia of Forensic Sciences* , Volumen 2, pp. 360 - 364.
- 72 Sosa Reyes , A. M., s.f. *Criminalística.mx*. [En línea]  
Available at: <http://criminalistica.mx/areas-forenses/quimica-forense/410-la-guca-del-pelo>  
[Último acceso: 12 Enero 2016].
- 73 Baciú, T., Borrull, F., Aguilar, C. & Calull, M., 2015. Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. *Analytica Chimica Acta*, Issue 856, pp. 1- 26.
- 74 Abad, D. L. J. S., 2007. *Instituto Anatómico Forense de Madrid*. [En línea]  
Available at:



---

[http://pendientedemigracion.ucm.es/info/medlegal/5%20Escuelas/escumedlegal/revista/articulos\\_pdf/1\\_5\\_2007.pdf](http://pendientedemigracion.ucm.es/info/medlegal/5%20Escuelas/escumedlegal/revista/articulos_pdf/1_5_2007.pdf) [Último acceso: 23 Diciembre 2015].

75 SoHT, 2014. *Society of Hair Testing. Statement of the Society of Hair Testing concerning the examination of drugs in human hair..* [En línea] Available at: [www.SOHT.org](http://www.SOHT.org) [Último acceso: 23 Enero 2016].

76 Coulter, C., Tuyay, J., Taruc, M. & Moore, C., 2010. Semi - quantitative analysis of drugs of abuse, including tetrahydrocannabinol in hair using aqueous extraction and immunoassay. *Forensic Science International*, Volumen 196, pp. 70 – 73

77 .-Imbert, L. y otros, 2014. Development and validation of a single SL-MS/MS assay following SPE for simultaneous hair analysis of amphetamines, opiates, cocaine and metabolites.. *Forensic Science International*, Volumen 234, pp. 132 - 138.

78 Cordero, R. & Paterson, S., 2007. Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS. *Journal Chromatography B*, Issue 850.

79 Musshoff, F. y otros, 2012. Evaluation of two immunoassay procedures for drug testing in hair samples. *Forensic Science International*, Volumen 215, pp. 60 - 63.

80 Fernandez, P. y otros, 2009. Optimization of a rapid Microwave assisted extraction method for the simultaneous determination of opiates, cocaine, and their metabolites in human hair. *Journal Chromatography B*, Issue 877, p. 1743.

81 Di Corcia , D. y otros, 2012. Simultaneous determination in hair of multiclass drugs of abuse (including THC) by ultrahigh performance liquid chromatography -tandem mass spectrometry. *Journal Chromatography B*, 154(899).

82 Kim, J. y otros, 2013. Simultaneous determination of 18 abused opioids and metabolites in human hair using LC-MS/MS and illegal opioids abuse proven by hair analysis. *Journal Pharm. Biomed. Anal*, 22(231).



- 83 Koster, R., Alffenaar, J., Greijdanus, B. & Uges, D., 2013. Fast and highly selective LC-MS/MS screening for THC and 16 other abused drugs and metabolites in human hair to monitor patients for drug abuse. *Ther. Drug Monit.*, Volumen 36, p. 234.
- 84 Montesano, C., Stybe Johansen, S. & Katrine Klose Nielsen, M., 2014. Validation of a method for the targeted analysis of 96 drugs in hair by UPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Issue 88, pp. 295 - 306.
- 85 Ramírez Fernández, M. d. M. y otros, 2014. A quantitative, selective and fast ultra - high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 33 basic drugs in hair (amphetamines, cocaine, opiates, opioids and metabolites). *Journal of Chromatography B*, Volumen 965, pp. 7 - 18.
- 86 Wu, Y., Lin., K., Chen, S. & Chang, Y., 2008. Simultaneous quantitative determination of amphetamines, ketamine, opiates and metabolites in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom*, Volumen 22, p. 887.
- 87 Barroso, M. y otros, 2010. Simultaneous quantitation of morphine, 6-acetylmorphine, codeine, 6-acetylcodeine and tramadol in hair using mixed - mode solid phase extraction and gas chromatography- mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem*, Volumen 396, p. 3059.
- 88 Aleksa, K. y otros, 2012. Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase micro extraction (SPME) with GC/MS. *Forensic Sciences International*, Volumen 218, p. 31.
- 89 Miguez Framil, M. & Cobarco, P., 2013. Matrix solid phase dispersion assisted enzymatic hydrolysis as a novel approach for cocaine and opiates isolation from human hair.. *Journal of Chromatography A*, Volumen 1316, p. 15.
- 90 Moller, M. y otros, 2010. Solid - phase microextraction for the detection of codeine, morphine and 6 - mono acetyl morphine in human hair by gas



---

chromatography - mass spectrometry. *Forensic Science International* , Issue 1996, p. 64.

91 Hill, V., Cairns, T. & Schaffer, M., 2008. Hair analysis for cocaine: factors in laboratory contamination studies and their relevance to proficiency sample preparation and hair testing practices. *Forensic Sciences International*, Volumen 176, p. 23.

92 Silbernagl, S., 2007. *Fisiología Humana. Texto y Atlas*. 7a edición ed. Madrid, España: Medica Panamericana.

93 Gjerde, H., Langel, K., Favretto, D. & Verstraere, A. G., 2015. Detection of illicit drugs in oral fluid from drivers as biomarker for drugs in blood. *Forensic Science International* , Volumen 256, pp. 42 - 45.

94 Jufer, R. A., Wstardik, A., Levine, S. & Cone, B., 2000. Elimination of cocaine and metabolites in plasma, saliva and urine following repeated oral administration to human volunteer. *Journal Analytical Toxicology*, Volumen 24, pp. 467 - 477.

95 Kacinko, S. L. y otros, 2004. Performance characteristics of the Cozart Rapid Screening Oral fluid drug testing System for opiates in comparison to ELISA and GC/MS following controlled codeine administration. *Forensic Science International*, Volumen 141, pp. 41 - 48

96 de Weerth, C., Jansen, J., H. Vos, M. & Maitimu, I., 2007. A new method for collecting saliva for cortisol determination. *Psychoneuroendocrinology*, 32(8 - 10), pp. 1144 - 1148

97 Mortier, K. A. y otros, 2002. Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* , Volumen 779, pp. 321 - 330 .

98 Cooper, G., Wilson, L., Reid, C. & Baldwin, D., 2005. Validation of the Cozart microplate EIA for analysis of opiates in oral fluid. *Forensic Science International*, Volumen 154, pp. 240 - 246



---

99 Dams, R. y otros, 2007. Oral fluids as an alternative matrix to monitor opiate and cocaine use in substance - abuse treatment patients. *Drug and Alcohol Dependence* , Volumen 87, pp. 258 - 267.