



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA".

DIPLOMADO EN QUÍMICA LEGAL.

TESINA

Determinación de Flunitrazepam en pelo por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas (CLAR-EM).

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA.

PRESENTA:
ROSALÍA PIÑA HERNÁNDEZ.

ASESOR: M en C. RODOLFO CARREÓN SÁNCHEZ.

MÉXICO D.F

JULIO DEL 2013



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.

CONTENIDO.

Págs.

1.- RESUMEN.	4
2.- INTRODUCCIÓN.	5
3.- OBJETIVOS.	7
4.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.	8
5.- MARCO TEÓRICO.	9
5.1.- Evidencias filamentosas.	10
5.1.1 Consideraciones generales.	10
5.1.2 Importancia del estudio de pelo en la Investigación criminalística.	11
5.1.3 Manejo de evidencias de tipo filamentosas.	11
5.2.- El pelo.	13
5.2.1 Morfología.	13
5.2.2 Origen y desarrollo.	16
5.2.3 Composición química.	17
5.2.4 Traumatología del pelo.	19
5.2.5 Determinación de interés criminalística.	22
5.2.6 Parámetros a considerar en el estudio con fines forenses.	22
5.2.7 Método de estudio.	23
5.2.8 Eliminación de drogas por pelo.	23
5.3.- Benzodiazepinas.	23
5.3.1 Estructura.	23
5.3.2 Clasificación.	25
5.3.3 Efectos farmacológicos.	27
5.3.4 Flunitrazepam.	29
5.3.5 Farmacocinética de las benzodiazepinas.	30
5.3.6 Farmacodinamia de las benzodiazepinas.	32
5.3.7 Aspectos legales.	34
5.4.- Pruebas presuntivas.	35

5.4.1 Pruebas cualitativas o colorimétricas.	35
5.5.- Pruebas confirmativas.	36
5.5.1 Pruebas cuantitativas.	36
5.5.2 La cromatografía de líquidos.	37
5.5.3 La espectrometría de masas.	40
5.5.4 La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Acoplado a Espectrometría de Masas (CLAR- EM).	41
5.5.5 Materia y equipo.	42
5.5.6 Método.	43
5.5.7 Resultados.	45
6.- ANÁLISIS DE RESULTADOS.	50
7.- CONCLUSIONES.	51
8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	52

1.- RESUMEN.

En este trabajo se llevó a cabo una recopilación documental de tipo retrospectivo, relacionando ciertas conductas delictivas con el consumo de Rofinol (cuyo principio activo es Flunitrazepam), así como las pruebas que permitan confirmar su presencia en pelo. Para ello se requiere conocer cómo tratar este tipo de muestras filamentosas, el desarrollo y composición química del pelo, estructura y propiedades de las benzodiazepinas, el proceso para llevar a cabo las pruebas confirmatorias por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas (CLAR-EM), describiendo también los fundamentos de estas técnicas analíticas. De esta manera se mostrará el potencial que tiene este método analítico en la identificación y cuantificación del flunitrazepam en el pelo, además de su utilidad en los procesos legales o forenses.

2.- INTRODUCCIÓN.

El flunitrazepam en el mercado se encuentra con el nombre comercial de Rofinol, es un sedante muy fuerte fabricado y distribuido por Hoffman-La Roche. Miembro de la familia de las benzodiazepinas, la cual incluye drogas tales como Librium, Xanax y Valium, el Rofinol (figura 1) es diez veces más fuerte que el Valium. Aunque Rofinol es usado en muchos países como un analgésico antes de una cirugía o para el tratamiento de insomnio, esta droga nunca ha sido aprobada para uso médico en los Estados Unidos debido a que hay disponible otras drogas más seguras.^{4,9}

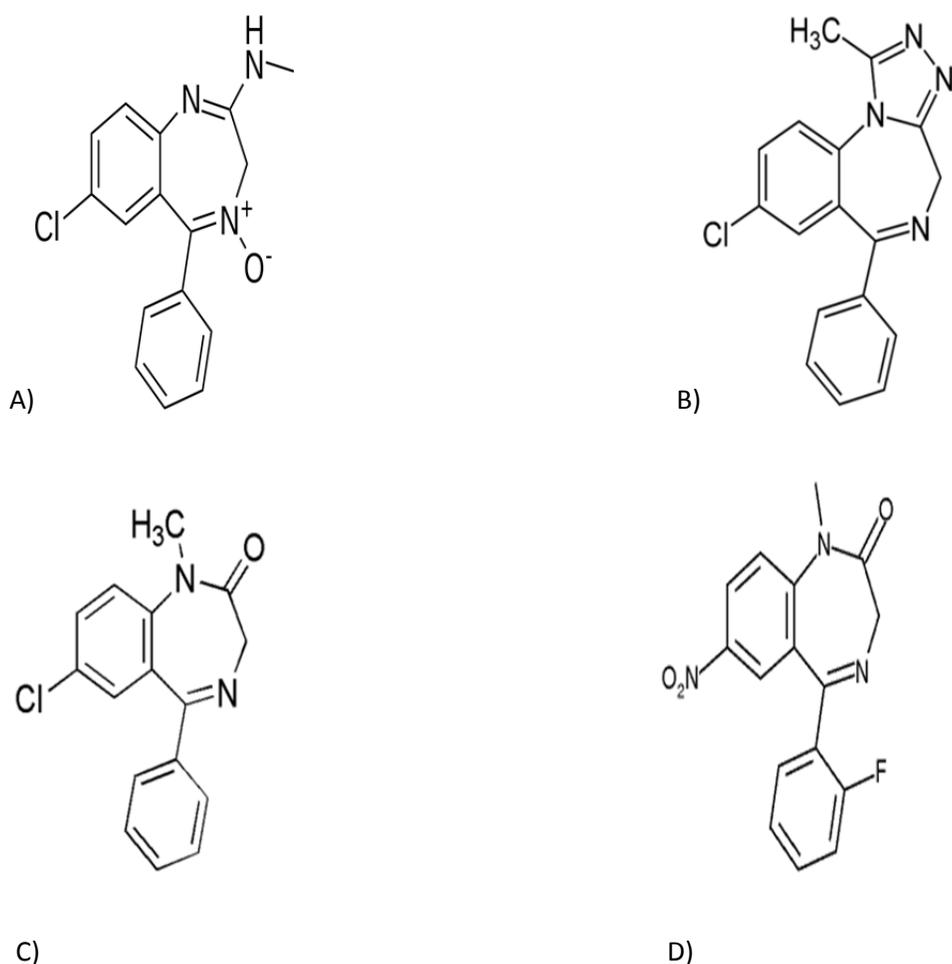


Figura 1.- Estructura química del A) Clordiazepóxido (Librium),

B) Alprazolam (Xanax), C) Diazepam (Valium), D) Flunitrazepam (Rofinol)⁴.

El Rofinol es un sedante, que a menudo se encuentra en los centros nocturnos y las fiestas, es usado por los jóvenes proporcionado principalmente por los que atienden estos centros nocturnos y los individuos cuyas intenciones son perpetrar asalto sexual. En muchos casos, el violador puede mezclar la droga en la bebida de una víctima que ignora este hecho. La combinación de esta droga con el alcohol aumenta sus efectos, en algunas ocasiones hasta el punto de causar la muerte^{6,8}.

Al Rofinol se le ha llamado la droga "para delitos sexuales" debido al potencial que tiene de causar desmayos y amnesia. En la pasada década, se han reportado casos de asalto sexual y violación por grupos donde a la víctima le fue dado este sedante. Se ha reportado que estas drogas han sido utilizadas en los ritos para iniciarse en una pandilla^{1,6,21}.

El pelo es un material importante de muestra para la determinación de sustancias de abuso. Debido a que todas las sustancias extrañas, a pesar de su naturaleza, llegan a ser absorbidas y permanecen en el pelo durante un gran periodo de tiempo².

En principio cualquier tipo de pelo (capilar, corporal, pecho, púbico, etc) es adecuado para los análisis de las sustancias de abuso. A pesar de ello lo adecuado es tomar un mechón de pelo de la parte trasera de la cabeza. **Los pelos o cabellos sueltos no son recomendables para la investigación.**²

El consumo de drogas puede ser detectado en el pelo durante mucho más tiempo que en la orina o en la sangre. Las sustancias extrañas se depositan en las raíces del pelo y son almacenadas permanentemente en la matriz del pelo. Para la detección de la sustancia se deben considerar los siguientes aspectos: la longitud del pelo tomando en cuenta que la media de crecimiento es de 1 cm por mes, tomando muestras de pelo de 12 cm de longitud, por ejemplo, puede mostrar el consumo de sustancias de abuso durante todo el año.³

3.-OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Mostrar un método analítico que permita la identificación y cuantificación de flunitrazepam en cabello para emplearse en procesos legales.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.-Conocer la morfología, origen, desarrollo y química del pelo.
- 2.-Saber la farmacología y toxicología del flunitrazepam (Rofinol)
- 3.-Establecer la relación del flunitrazepam con diferentes delitos.
- 4.- Señalar la importancia de la cadena de custodia en el manejo de indicios filamentosos.
- 5.-Mostrar el potencial que tienen las técnicas analíticas Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (CLAR-EM) en la detección de flunitrazepam.

4.-PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

Actualmente en el proceso de impartición de justicia, se requiere de procedimientos analíticos validados para la identificación y cuantificación de drogas de abuso que permitan aportar la mayor cantidad de pruebas para el esclarecimiento de hechos delictivos.¹⁹

Debido a la gravedad de incidencias de asalto sexual es importante mostrar a las ciencias forenses el potencial que tienen, las técnicas analíticas y que permitan el esclarecimiento de hechos ilícitos siendo muy importante el papel del químico en este ámbito.³⁵

El flunitrazepam es una de la benzodiazepinas más comúnmente utilizadas en jóvenes, pero también muy relacionada con delitos sexuales y conductas violentas, aunado a la amnesia que afecta la memoria episódica, la habilidad de recordar experiencias personales.²¹ La droga también disminuye la actividad psicomotora.¹³ La sedación aparece veinte o treinta minutos después de ingerir un comprimido de dos miligramos y dura aproximadamente ocho horas dando oportunidad a los agresores de cometer el delito.¹¹

También se ha implicado al flunitrazepam en casos de asesinos en serie que ejercen actos de violencia quienes presentan luego amnesia temporal. Quienes abusaron del flunitrazepam en el momento de sus crímenes mostraron violencia extrema, carecían de la capacidad de pensar con claridad y experimentaron una pérdida de empatía por sus víctimas.¹⁵ También informan que el abuso del licor y otras drogas en combinación con el flunitrazepam empeoraba la situación y que el comportamiento bajo la influencia de flunitrazepam se oponía al estado psicológico normal del individuo.¹⁰

Debido al incremento de incidencias violentas y abuso sexual, donde está involucrado el rofinol es necesario aportar a las ciencias forenses métodos que permitan identificar rápidamente drogas involucradas en hechos ilícitos, apoyándose de técnicas analíticas confirmativas, por todo lo anterior en este trabajo se describe la importancia de la aplicación de la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (CLAR-EM), con especial énfasis en la detección de flunitrazepam en muestras clínicas y forenses.^{25,26}

5.- MARCO TEÓRICO.

El pelo es una estructura filamentososa, flexible y elástica de la piel de los mamíferos que cumple varias funciones, entre las que cabe destacar: aislamiento térmico para la conservación del calor; protección frente a las agresiones, al proporcionarles una cubierta que no se lesiona ni sangra y que puede advertirlos de cualquier contacto potencialmente dañino; percepción de objetos y defensa de radiaciones lumínicas.^{3,11}

El análisis de drogas en pelo puede determinar un perfil cronológico del consumo y decir si la persona consume ocasionalmente o de forma continua. También nos puede indicar de forma orientativa las cantidades que consume y el tipo de droga que consume.²

Este análisis de drogas en el pelo se puede emplear en selección de personal, para determinados puestos de trabajo, sabiendo previamente el aspirante que se le van a hacer controles de estas características.^{2, 3,7}

5.1.- EVIDENCIAS FILAMENTOSAS.

La elevada frecuencia con que los elementos filamentosos componen los vestigios materiales de la perpetración de una conducta delictiva, así como el cúmulo y variedad de la información que el criminalista puede obtener de su análisis. Los pelos y fibras merecen un tratamiento común tendiente a diferenciarlos y a identificarlos. El pelo como indicio tiene un valor limitado, pero resulta un elemento de sumo interés por su persistencia y su resistencia a los agentes físicos, químicos y biológicos. Además reviste especial importancia en los casos de identificación de restos cadavéricos.²

5.1.1 Consideraciones generales.

Diversas características del pelo son las que le confieren su notable valor en la investigación criminalística, a saber:

- a) Diversidad individual que, dentro de ciertos límites, hace posible la identificación de su origen.
- b) Su localización predominante en el exterior del cuerpo permite que frente a cualquier contacto violento, fácilmente sea removido de su implantación original, así como frecuentemente se constituya en soporte de sustancias de interés para la investigación, como sangre, semen, aceite, pintura o derivados de la deflagración de la pólvora.
- c) La compleja y particular configuración de la capa celular superficial del tallo piloso, le proporciona alta adhesividad a las ropas y a las superficies no pulimentadas.
- d) La renovación periódica condiciona su caída natural y posibilita la transferencia a objetos cercanos o puestos en su contacto.
- e) Su resistencia a la putrefacción y a la acción de agentes químicos y físicos le permiten larga permanencia aun después de que los rasgos faciales y los dibujos dactilares han sido alterados. Si bien son más resistentes que los tejidos blandos, no lo son más que los huesos o los dientes.

- f) La conservación de su estructura característica se mantiene a pesar de largos periodos de enterramiento, de estancia en el agua o en medios desfavorables, como el jugo gástrico y la falta de humedad.²

5.1.2 Importancia del estudio de pelo en la Investigación criminalística.

A continuación se mencionan algunas situaciones en las que el estudio de los elementos filamentosos constituye una parte fundamental de la investigación criminalística:

- a) En los hechos de tránsito en los casos en el que el pasajero fallece y el chofer sobrevive la presencia de pelos, en algunas partes de la cabina del vehículo, orienta con respecto al lugar que ocupan los diferentes participantes. La observación de cabellos semejantes a los de un sujeto atropellado, en los adornos o aditamentos de la suspensión de un vehículo, establece la conexión entre ambos. El hallazgo de pelo procedente de cierto sujeto, en la vestidura de un automóvil, pone de manifiesto el empleo del vehículo para el transporte de un secuestrado.³
- b) En ataques sexuales los pelos de la víctima en el pubis o la ropa interior de un sospechoso, o el pelo púbico del supuesto perpetrador en el cuerpo de la víctima constituyen evidencias de gran valor en la investigación.³
- c) En las armas empleadas para lesionar a un sujeto, puede contener pelos procedentes de la víctima, especialmente en elementos que entran en contacto íntimo con el cuero cabelludo.³
- d) Los pelos arrancados al victimario durante un asalto, o en la comisión de un homicidio o de raptó, se encuentra en las manos de la víctima o en el lugar de los hechos, en manchas de sangre, en la ropa o en la cama.³

5.1.3 Manejo de evidencias de tipo filamentosas.

La condición previa al manejo de cualquier indicio es el manejo adecuado del lugar de los hechos e indicios

- a) **La preservación:** es evitar que el lugar sea alterado por personas ajenas a la investigación.²
- b) **La búsqueda:** No existe una regla general para la búsqueda de estos indicios, únicamente el estudio particular de cada hecho será el que norme la conducta del investigador. Las manos y ropas del cadáver; las armas; las ropas de cama, toallas y lugares destinados a la higiene; las manchas; los peines, cepillos y sombreros; los sitios de acceso y de salida, así como los objetos extraños al lugar son algunos elementos que primero deben ser examinados.²
- c) **La fijación:** Una vez localizado el objeto filamentosos, se procede a su fijación mediante la descripción, el croquis y la fotografía, sin olvidar detallar la ubicación exacta del mismo.²
- d) **La recolección:** Siempre que sea posible, el indicio será colectado con su soporte original, será recogido con pinzas cuyos brazos estén protegidos con tubos de hule. En caso de tener algún detenido se le pedirá que se desvista parado sobre grandes hojas de papel limpio.²
- e) **El embalaje:** Se deben de utilizar contenedores perfectamente limpios como bolsas de plástico, bolsas de celofán, recipientes de vidrio, cajas de cartón, hojas de papel, sellar la muestra para evitar su pérdida o sustitución.²
- f) **La identificación:** Cada contenedor debe de llevar inscrito datos como número de investigación; lugar, fecha y hora de recolección; nombre y firma del investigador; descripción naturaleza y localización.²
- g) **La cadena de custodia:** debe ser mantenida con toda acuciosidad, de manera que en todo momento se sepa dónde está la muestra, en posesión de quien ha estado y a cuales operaciones ha sido sometida.²
- h) **La muestra testigo:** en caso de tener un sujeto de referencia se tomara la muestra de la región frontal, occipital o temporal de la cabeza. En los casos de ataque sexual se peinará el pelo púbico de la víctima.^{2,3}

5.2.- EL PELO.

La historia evolutiva del pelo es un verdadero enigma. Cualquiera que haya sido su origen, queda claro que los mamíferos deben mucho de su éxito evolutivo a las propiedades de esta cobertura pilosa. Paradójicamente, la migración de los seres humanos desde su sabana ancestral para poblar la tierra se relaciona con una reversión hacia la desnudez y aún manteniendo su temperatura corporal. Por razones evolutivas, los folículos pilosos no se encuentran todos regidos por los mismos mecanismos de control. Al igual que con el pelo de los animales, los cambios estacionales o de temperatura ambiente provocan la caída y el reemplazo posterior de los pelos. Este proceso parecía obedecer a un ritmo propio, modificado por las hormonas circulantes, tales como los esteroides o la tiroxina, cuya secreción es, a su vez controlada por el hipotálamo y la hipófisis. De alguna forma sutil, estos mecanismos aún son importantes para el “homo sapiens”.³

5. 2.1 Morfología.

Anatómicamente el cabello presenta la misma estructura que cualquier otro tipo de pelo, aunque la implantación en la piel es más profunda que en el resto, ya que el folículo llega hasta la hipodermis. Las glándulas sebáceas son órganos secretores exocrinos que producen una sustancia grasa llamada sebo y desembocan dentro de cada folículo, se sitúan en la parte media de la dermis asociadas al folículo piloso al que van a desembocar. Las glándulas sebáceas se distribuyen por toda la piel, excepto en las regiones palmo plantares y son muy abundantes en el cuero cabelludo, en la cara y en la zona superior del pecho, en el pubis y en las axilas.^{3,36}

Existen fibras musculares lisas asociadas a cada pelo (músculo erector del pelo). La contracción de los músculos hace que el pelo se erice, cambiando así su ángulo con relación a la piel. Este proceso incrementa las posibilidades aislantes de la cubierta del pelo, proporcionando así un mejor abrigo contra el frío.^{2, 36}

En los folículos pilosos de las axilas y zonas genitales existen también glándulas sudoríparas endócrinas, que son las responsables en parte del olor corporal característico de cada persona.^{2, 36}

a) Características macroscópicas del pelo.

El pelo está constituido por un tallo filamentosos de sección más o menos circular o triangular y de longitud variable, así como dos extremos: el proximal o raíz, y el distal o punta.¹

Extremo proximal o raíz se encuentra anclado en la dermis dentro de una formación sacular llamada folículo piloso. El folículo consiste en una invaginación de las células de la epidermis que ha penetrado en forma oblicua hasta el interior de la dermis. Presenta en su parte más profunda una escotadura donde se aloja la papila del pelo, en la que se encuentra un sistema capilar arteriovenoso que proporciona nutrición a la matriz y una terminación nerviosa de tipo trófico que regula el crecimiento del elemento piloso. Alrededor de la papila de forma lenticular se halla la matriz: conjunto de células no pigmentadas que da lugar al crecimiento del pelo. Por arriba de la matriz, las células recién formadas reciben el pigmento (melanina), que será responsable del color del pelo, e inicia la producción de proteínas (queratina) que las dota de consistencia córnea,²(figura 2)

A la altura en que se inicia el canal, la pared del folículo presenta una dilatación localizada en la porción del ángulo obtuso y que corresponde a la glándula sebácea; esta glándula vierte su secreción al canal folicular y por ahí sale al exterior, esta secreción está compuesta por lípidos y carbohidratos, recubre la superficie del tallo y le proporciona protección contra agentes físicos y químicos del exterior.^{2, 36}

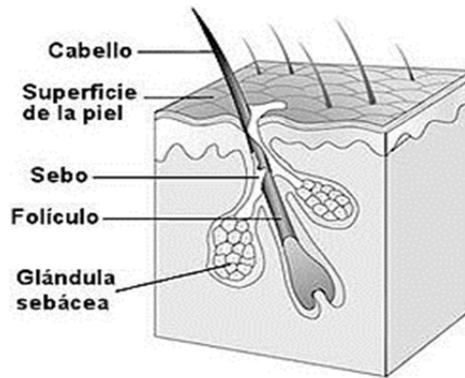


Figura 2.- Representación esquemática del folículo piloso³⁷.

El tallo es la parte libre del pelo que flota en la atmosfera, crece a partir de la matriz y está constituido en su totalidad por células muertas queratinizadas. Es un elemento fusiforme de longitud variable, misma que es influenciada por las costumbres higiénicas de su poseedor y por la moda imperante. Su diámetro se encuentra entre 90 y los 160 micrómetros (micras) en el hombre; en la mujer el rango es de 50 a 90 micrómetros¹.

El extremo distal o punta es de forma variable y se encuentra expuesto a las agresiones del medio, así como a los cuidados y al capricho de su propietario. Cuando no ha sido cortado, se observa como una porción coniforme del tallo que se va adelgazando paulatinamente hasta terminar en punta¹.

b) Características microscópicas del pelo.

El pelo está constituido por tres porciones con diferentes peculiaridades histológicas.

La **cutícula** es la porción más externa y se halla constituida por una sola capa de células planas, cornificadas, translucidas sin núcleo y sin pigmento. Básicamente existen *tres tipos de células*. **Coronales** en una sola envuelven todo el diámetro del pelo, semejantes a una pila de vasos de papel. **Espinosas**, son escamas mas o menos triangulares que sobresalen de la superficie del tallo piloso, nunca se presentan en humanos. **Aplanadas o imbrincadas**, son células estrechas que se traslapan produciendo complicados diseños. Son las más frecuentes observadas en el pelo humano. ³

Porción media o corteza es la región que se encuentra inmediatamente por debajo de la cutícula y proporciona al pelo humano la mayor parte de su grosor, más del 60%. Esta formada por células nucleadas, elongadas en forma de huso, dispuestas paralelamente al eje longitudinal y fuertemente adheridas entre sí por cemento intercelular. En su interior se encuentran haces de fibrillas de queratina y granos de un pigmento llamado melanina. Las fibrillas de queratina son más abundantes conforme las células se alejan del bulbo; situación que condiciona una reducción progresiva del espacio en que se aloja el núcleo y otros organelos celulares.³

Porción medular constituye la parte central del pelo pero no todos los pelos la presentan. Está compuesta por células poliédricas arregladas en columnas que forman un retículo en el que se encuentran incluidos grandes espacios aéreos. Cuando la médula está presente, puede mostrar tres tipos de disposición:

- a) Continua a todo lo largo del tallo.
- b) Discontinua en el caso de que presente breves interrupciones.
- c) Fragmentada cuando está constituida por pequeños fragmentos separados por amplias brechas.^{2,3}

5.2.2 Origen y desarrollo.

El pelo no crece de manera indefinida, sino que tiene un crecimiento cíclico, al que se le llama *ciclo piloso*. Cada folículo posee su propio ciclo, independiente de los que haya a su alrededor, (figura 3).³⁶

- *Fase anágena o Anagen*: Se inicia cuando el pelo emerge de la superficie cutánea, el pelo está pegado a la papila, nace y crece rápidamente en sentido longitudinal. Dura entre cuatro y seis años, aunque normalmente se toma como valor medio tres años. La forma del folículo en esta fase es similar a la de una cebolla, más ancha en la base que en el tallo. El pelo crece sin cesar debido a que las células de la matriz del folículo se dividen por mitosis constantemente. En esta fase se encuentra el 85-95% de los pelos de la cabeza de un adulto.

- *Fase catágena o Catagen:* Es una fase de transición. Se extiende unas tres semanas, durante las cuales el crecimiento se detiene y se separa el pelo del bulbo que le dio origen, cesando la actividad de las células de la matriz, incluido los melanocitos. El bulbo toma un aspecto cilíndrico. En esta etapa está el 1% de los pelos de la cabeza.
- *Fase Telógena o Telogen:* Es la fase del descanso y de caída del pelo, dura unos tres meses. Las estructuras que se pierden son aquellas que contienen queratina y se conservan las que no contienen esta proteína. La raíz del pelo toma un aspecto de cerilla y permanece insertado en el folículo. El bulbo se prepara para iniciar un nuevo ciclo. La proporción de elementos que están en esta fase es del 4-14%.²

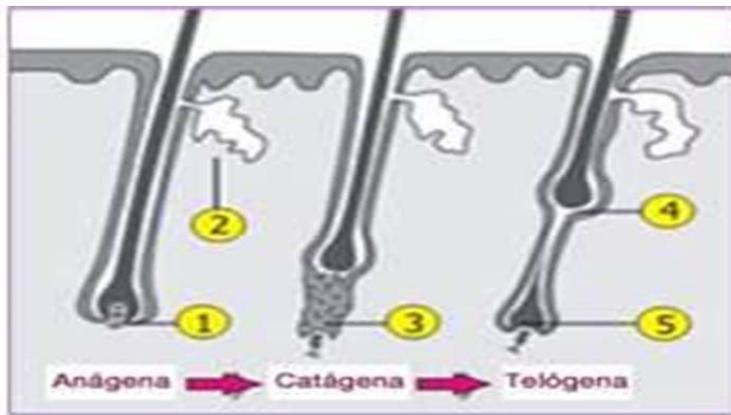


Figura 3.- Representación esquemática del ciclo piloso.³⁷

5.2.3 Composición química.

El pelo está constituido por proteínas (28 %), lípidos 2 % y en pequeñas cantidades sales minerales y sustancias hidrófilas, aproximadamente el 70 % de agua. La sustancia de sostén del pelo es la queratina que esta formada por macro moléculas constituidas por largas cadenas de aminoácidos que se unen entre si. Al tiempo que el nuevo pelo va recorriendo el folículo, sus células se van queratinizando a fin de que pueda afrontar con suficiente fuerza una vida de exposición a la intemperie. Lleno de vigor, empuja fuertemente hacia fuera a su cabello antecesor.^{3,2}

Entre los elementos constantes cabe destacar los siguientes:

a) *Componentes primarios o mayores* que comprenden la queratina y la melanina.

La queratina, del griego Keras=cuerno, comprende en realidad un grupo de proteínas de estructura química muy similar y con alto contenido de azufre; infunden dureza a las células que las contienen. Dos son las variedades más importantes: la fibrilar y la matriz proteica, esta última es una sustancia amorfa que envuelve a las microfibrillas y las mantiene formando haces. Representa el principal componente del pelo, la piel, las uñas, los cuernos, las plumas, las pezuñas y la lana. Son insolubles en agua, disolventes orgánicos, ácidos y álcalis diluidos; a diferencia de la mayoría de las proteínas.³

La melanina. La coloración de la piel, del iris y del pelo está determinada por la presencia de un pigmento insoluble llamado melanina.

El color de los elementos orgánicos pigmentados es determinado por la herencia, siendo los tonos oscuros dominantes y los claros recesivos. Las diferencias raciales en el color del pelo, de la piel y del iris son debidas a variaciones en la cantidad de melanina presente y no a diferencias de calidad. La melanina (del griego Melanos=negro) es un polímero de los productos de oxidación de la tirosina; es decir, está compuesta de un número variable de unidades básicas de indol-5,6-quinona. En función del número de unidades combinadas y de la abundancia de granos melánicos, el color final varía del café claro al negro. Con respecto al color rojo, unos autores³ opinan que se debe a la presencia de dopacromo, un producto intermedio en la síntesis de la melanina; mientras otros⁴ señalan como causa la presencia de hierro en las moléculas del pigmento.

La síntesis de la melanina se realiza en el interior de unas células especializadas llamadas melanocitos, las cuales se encuentran en la capa profunda de la epidermis y en la parte alta del bulbo piloso, por arriba de la matriz. El melanocito es una célula secretora altamente diferenciada que posee largas prolongaciones de su cuerpo, llamadas dendritas, con las cuales literalmente inyectan los granos de pigmento compuestos de melanoproteína (Melanina unida a una sustancia de naturaleza proteica) a las células recién formadas por la capa germinativa de la piel o por la matriz del pelo.³

Las canas se deben a la ausencia total de pigmento en un pelo, debido a la suspensión en la producción de la melanina o a su remoción por ciertas células llamadas melanófagos. Es un fenómeno que en forma natural se instala paulatinamente entre los 35 y 40 años; empieza en la porción proximal del pelo de la región temporoparietal y después se disemina al resto de la cabeza y del cuerpo.³

- b) *Componentes menores* que incluyen secreción sebácea, ácido úrico, colesterol, ciertas vitaminas y antígenos del sistema ABO (grupos sanguíneos en humanos donde se identifica antígeno A, antígeno B, y "O").³

Los componentes más frecuentes detectados son: sodio, zinc, bromo, galio, cobre, antimonio, cobalto, oro, mercurio, arsénico y manganeso. Otros menos comunes comprenden: cloro, molibdeno, tungsteno, plata, plomo, sílice, fósforo, hierro, germanio y cesio.³

5.2.4 Traumatología del pelo.

Consiste en el estudio interpretativo de las lesiones sufridas en el pelo como consecuencia de la aplicación de violencia.

Para fines de estudio, los agentes que pueden actuar sobre los elementos pilosos se dividen en físicos, químicos y biológicos.

Los **agentes físicos** más comunes son: tracción, contusión, corte, fricción y calor.

- **Tracción.** Cuando el pelo es jalado con una fuerza superior al tallo piloso se puede producir ruptura total o parcial del tallo o arrancamiento del bulbo. El cabello que cae espontáneamente muestra un bulbo lleno, repleto bien formado, lo que significa que ha llegado a su completo crecimiento. En cambio los que tienen un bulbo hueco o excavado, por no haber llegado a su completo desarrollo, indican que fueron arrancados. Cuando el hecho a sido muy violento se pueden encontrar, que en la raíz hay partículas o células de piel adyacentes colgada a la misma.
- **Contusión.** Se produce cuando el pelo es aplastado o contundido entre dos planos duros, observándose ensanchamiento de la zona.

- Corte. Estas lesiones son causadas por instrumentos cortantes de una sola hoja, como la navaja, o de dos hojas articuladas como las tijeras. El cabello recién cortado, muestra en el extremo seccionado más o menos bordes limpios, netos, formando ángulos agudos, según el filo del instrumento cortante. Pasando los tres días, la punta del pelo cortado empieza a redondearse convexamente, debido al crecimiento y a las distintas sustancias.²
- Fricción. El continuo y prolongado roce del pelo con una superficie resistente como la ropa, los cepillos de fibras plásticas o el peine, así como el uso repetido de pasadores, produce alteraciones en las estructuras celulares de la punta o del tallo.²
- Calor. Es muy importante conocer la temperatura a la cual se quema el pelo, se determinó que a 100°C, el cabello se acorta y pierde peso; a 150°C, presenta burbujas gaseosas en su médula y a 300°C, se carboniza. Estos datos son útiles para determinar a qué temperatura ha sido expuesto el cuerpo de la víctima. El calor produce alteraciones anatómicas del pelo, indicando éstas si el cabello fue sometido a la llama o al calor radiante. Los pelos comienzan a sufrir en su microestructura hacia los 140 – 150°C, a esta temperatura las burbujas aéreas, en la sustancia medular, aumentan de tamaño y estallan, sintiendo la resistencia de la cutícula. Para otros autores¹ este fenómeno tiene lugar a los 200°C. A los 260°C comienza la carbonización, la cual es completa³ a los 300 – 400°C.^{2,3}

Agentes químicos. El pelo es altamente resistente a agentes ácidos y alcalinos, cualidad que es debida a la insolubilidad de la queratina en la mayoría de esos agentes. La excepción son los sulfuros inorgánicos, el ácido mercaptoacético y el ácido tioglicólico que atacan la unión disulfuro de la queratina y por despolimerización destruyen la estabilidad de esta proteína, (figura 4) es por ello que son empleados como depiladores y en la realización de rizado permanente artificial. Los agentes oxidantes como el hipoclorito de sodio concentrado disuelven rápidamente el pelo y la lana.

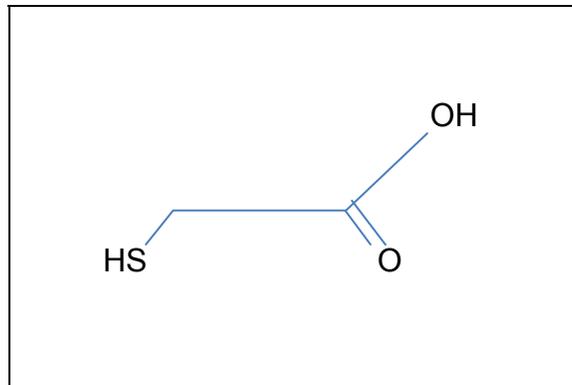


Figura 4.- Estructura del ácido mercaptoacético o tioglicólico.³⁸

Las sustancias alcalinas como el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) o el hidróxido de sodio (sosa cáustica) producen decoloración del pelo, la magnitud de esta alteración se encuentra en relación directa con el tiempo de exposición y la concentración del agente, incluso puede llegar hasta la decoloración total.

Por su parte, sustancias fuertemente ácidas, como el ácido sulfúrico o el clorhídrico, producen deshidratación del pelo hasta carbonización, dependiendo del tiempo de contacto, el que generalmente debe ser largo. Como muestra de resistencia basta recordar la existencia de tricobenzoares; es decir, tumores constituidos por la acumulación de pelos en la luz del tubo gastrointestinal, especialmente en el estómago, donde persisten a pesar del jugo gástrico fuertemente ácido y de las activas enzimas digestivas.²

Agentes biológicos. El tallo piloso por su consistencia córnea y por la secreción sebácea de que está recubierto, resiste la agresión de los agentes biológicos. La putrefacción no le causa ninguna alteración estructural; la muerte de su propietario produce sólo cambio en la coloración, tornándola café ceniza, lo cual empieza a observarse a los tres meses. La desnutrición crónica da lugar a que el pelo adquiera coloración rojiza y aspecto opaco.^{2,3}

Únicamente en el caso de que se afecte el folículo piloso, es cuando se altera el crecimiento, el desarrollo y la consistencia del pelo. Padecimientos infecciosos del cuero cabelludo, desnutrición y alteraciones hormonales modifican sensiblemente el desarrollo piloso y condicionan su caída o su putrefacción.³

5.2.5 Determinación de interés criminalístico.

El examen de los elementos pilosos proporciona valiosa información que aunque no siempre permite una identificación personal positiva, sí contribuye notablemente a la investigación y al esclarecimiento de los hechos antisociales.

Los parámetros que se pueden determinar mediante su estudio sistemático y completo, comprenden:¹⁹

- a) Naturaleza del elemento.
- b) Origen humano
- c) Origen racial
- d) Región corporal de procedencia
- e) Sexo
- f) Edad
- g) Alteraciones del color.
- h) Marcadores genéticos
- i) Elementos inorgánicos

5.2.6 Parámetros a considerar en un estudio con fines forenses.

El examen criminalístico del pelo tiene como finalidad primordial el establecer, ya sea en forma directa o por exclusión, el origen de una muestra de pelo, así como las circunstancias que mediaron en la producción del hecho sujeto a investigación y que dejaron huella sobre los elementos pilosos.²³

- a) Color
- b) Longitud
- c) Bulbo
- d) Punta
- e) Tallo
- f) Cutícula
- g) Corteza
- h) Médula

5.2.7 Método de estudio.

El estudio criminalístico del pelo es un examen eminentemente comparativo entre la muestra problema y las muestras testigo.

El instrumental requerido comprende microscopio estereoscópico, microscopio de comparación con cámara fotográfica, micrómetro de platina, retícula ocular y un sistema para fotografiar indicios.²⁴

5.2.8 Eliminación de drogas por pelo.

Las drogas se incorporan al pelo siguiendo tres mecanismos:

- Por difusión activa o pasiva desde la sangre al folículo piloso
- Por el sudor
- Por contaminación ambiental, se rechaza por lavado y fijación capilar, por lo que se descarta como alegación para quedar eximido de un posible consumo.²⁰

5.3.- BENZODIACEPINAS

5.3.1 Estructura.

Las **benzodiazepinas** son medicamentos psicotrópicos que actúan sobre el sistema nervioso central, con efectos sedantes, hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivos, amnésicos y miorrelajantes (relajantes musculares). Por ello se usan las benzodiazepinas en medicina para la terapia de la ansiedad, insomnio y otros estados afectivos, así como las epilepsias, abstinencia alcohólica y espasmos musculares.⁵ También se usan en ciertos procedimientos invasivos como la endoscopia o dentales cuando el paciente presenta ansiedad o para inducir sedación y anestesia.⁶ Los individuos que abusan de drogas estimulantes con frecuencia se administran benzodiazepinas para calmar su estado anímico. A menudo se usan

benzodiazepinas para tratar los estados de pánico causados en las intoxicaciones por alucinógenos.¹²

El término benzodiazepina se refiere a la parte de la estructura, compuesta por un anillo de benceno (A) fusionado con un anillo de diazepina de siete miembros (B). Sin embargo, como todas las benzodiazepinas importantes contienen un sustituyente 5-aril (anillo C) y un anillo 1,4-diazepina, el término se refiere ahora a las 5-aril-1,4-benzodiazepinas,¹¹ figura 5.

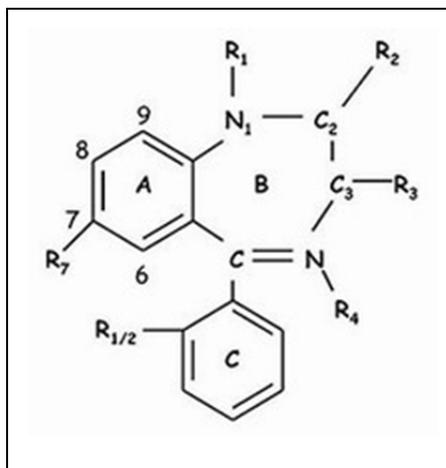


Figura 5.- Estructura general de las benzodiazepinas.¹¹

Cada benzodiazepina surgirá por sustitución de radicales en diferentes posiciones. La naturaleza química de los sustituyentes en las posiciones 1 a 3 puede incluir anillos triazol o imidazol fusionados en las posiciones 1 y 2. La sustitución del anillo C con una función ceto en la posición 5 y un sustituyente metilo en la posición 4 son aspectos estructurales importantes del antagonista de la benzodiazepina llamado flumazenil,¹¹ (figura 6).

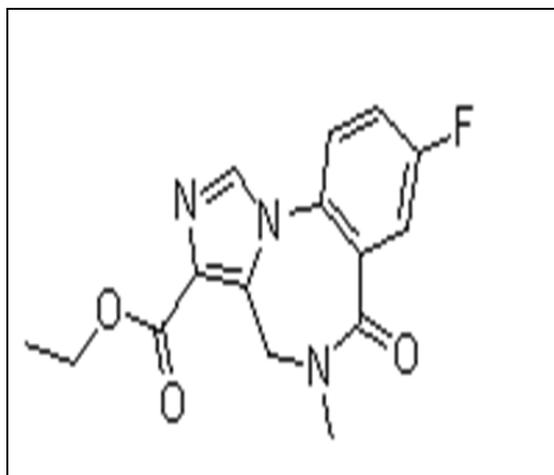


Figura 6.- Estructura del flumazenil.¹¹

5.3.2 Clasificación de las benzodiazepinas.

Los fármacos activos al nivel del receptor de las benzodiazepinas se pueden clasificar en cuatro categorías, según su vida media, la cual varía de 2 horas, como el midazolam y el clorazepato hasta 74 horas como el flurazepam:¹¹

- Compuestos de duración ultra-corta, con un tiempo de vida media menor de 6 horas. (Tabla 1)
- Compuestos de duración corta, tienen un tiempo de vida media menor de 12 horas y tienen pocos efectos residuales al tomarse antes de acostarse en la noche, aunque su uso regular puede conducir a insomnio de rebote y ansiedad al despertar. (Tabla 2)
- Compuestos intermedios, tienen un tiempo de vida media entre 12 y 24 horas, pueden tener efectos residuales durante la primera mitad del día y el insomnio de rebote tiende a ser mas frecuente al discontinuar su uso. Se presentan también síntomas de abstinencia durante el día con el uso prolongado de esta clase de benzodiazepinas.(Tabla 3)
- Compuestos de acción larga, tienen un tiempo de vida media mayor de 24 horas. Los fuertes efectos sedativos tienden a perdurar durante el día siguiente si se usan con el fin de tratar el insomnio (tabla 4).

BENZODIACEPINA	Vida media T_{1/2}(h)	METABOLITO
Clobazam	9-60	Desmetilclobazam
Cloracepato	Muy corta	Desmetildiacepam
Clorodiacepóxido	5-30	Desmetildiacepam
Diacepam	14-100	Desmetildiacepam
Fluracepam	Muy corta	Desalquilfluracepam
Halacepam	9-28	Desmetildiacepam
Ketazolam	2	Desmetildiacepam
Medacepam	1-2	Desmetildiacepam
Pracepam	29-193	Desmetildiacepam
Quacepam	27-40	Desalquilfluracepam

Tabla 1. Acción prolongada, tiempo de vida media efectiva superior a 24 horas¹⁵

BENZODIACEPINA	Vida media T_{1/2}(h)	METABOLITO
Bromacepam	7.9-19.3	No
Flunitrazepam	15-30	Desmetilflunitrazepam
Nitrazepam	15-38	2-amino-5-nitrobenzofenona

Tabla 2. Acción intermedia, tiempo de vida media entre 14 y 24 horas¹⁵

BENZODIACEPINA	Vida media T_{1/2}(h)	METABOLITO
Alprazolam	12-15	Alfa-hidroxi-alprazolam
Loprazolam	7-21	Dudoso
Loracepam	10-18	No
Lormetacepam	9-15	Loracepam
Oxacepam	5-12	No
Temacepam	5-22	oxacepam

Tabla 3. Acción corta, tiempo de vida media entre 6 y 14 horas.¹⁵

BENZODIACEPINA	Vida media T_{1/2}(h)	METABOLITO
Brotizolam	1-1.5	No
N-fidazolam	1-1.5	No

Tabla 4. Acción ultracorta, tiempo de vida media menor de 6 horas.¹⁵

5.3.3 Efectos farmacológicos.

Las benzodiazepinas ejercen, básicamente las acciones farmacológicas descritas a continuación:

a) **Acción ansiolítica:** disminuye la actividad motora, la agresividad y la evitación pasiva, suprime el miedo.

Desde el punto de vista clínico reduce la tensión emocional, aunque excepcionalmente pueden producir efectos paradójicos de irritabilidad y hostilidad.

En personas sanas y a dosis terapéuticas, no altera la realización de ejercicio físico, pero a dosis mayores producen sopor, letargia, sueño, ataxia y debilidad muscular.

b) **Acción relajante muscular:** Es una característica de todas las benzodiazepinas aunque variable según el tipo de compuesto. Su mecanismo implica varias estructuras del SNC (Sistema Nervioso Central): médula espinal, formación reticular, ganglios basales y cerebelo. Este efecto relajante es deseable como complemento terapéutico en cuadros de ansiedad con tensión muscular.

c) **Acción anticonvulsiva:** Sus acciones anticonvulsivas se ejercen tanto en convulsiones experimentales (estricnina, cardiazol, electroconvulsiva) como clínicas (convulsiones febriles, epilépticas, etc). El diacepam es especialmente útil en el tratamiento de cuadros epilépticos.

d) **Acción hipnótica:** las benzodiazepinas son inductoras del sueño, aunque presentan diferencias entre una y otras fundamentalmente por razones farmacocinéticas. ¹²

Tabla 5.

Acción	Uso clínico
Ansiolítico - para aliviar la ansiedad.	- Ansiedad y trastornos de pánico, fobias.
Hipnótico - para facilitar el sueño.	- Insomnio.
Miorrelajante - para la relajación muscular.	- Espasmos musculares, trastornos espásticos.
Anticonvulsivo - contra los ataques, de las convulsiones.	- Ataques causados por intoxicación a causa de la ingestión de drogas, algunas formas de epilepsia.
Amnesia - deterioro de la memoria a breve plazo.	- Premedicación antes de operaciones, sedación en intervenciones de cirugía menor.

Tabla 5. Efectos farmacológicos de las benzodiazepinas.⁵

Otras aplicaciones clínicas utilizando una combinación de efectos:

- Desintoxicación del alcohol
- Psicosis acompañada por hiperexcitabilidad y agresividad

5.3.4 Flunitrazepam.

El Flunitrazepam se sintetizó en 1970 por Roche y es usado hospitalariamente como sedante quirúrgico. Ingresó al mercado en Europa en 1975, y a partir de los años 1980 comenzó a estar disponible en otros países. Apareció en Estados Unidos en los años²¹ 1990.

Existen presentaciones en comprimidos de 1 y 2 mg, en ampolletas de 2 mg y en supositorios de 1 y 2 mg.

Ansiolítico benzodiazepínico de acción intermedia. Actúa incrementando la actividad del ácido gamma-aminobutírico (GABA), un neurotransmisor inhibitor que se encuentra en el cerebro, al facilitar su unión con el receptor GABAérgico. Posee actividad hipnótica, anticonvulsivante, sedante, relajante muscular y amnésica,²¹ figura 7.

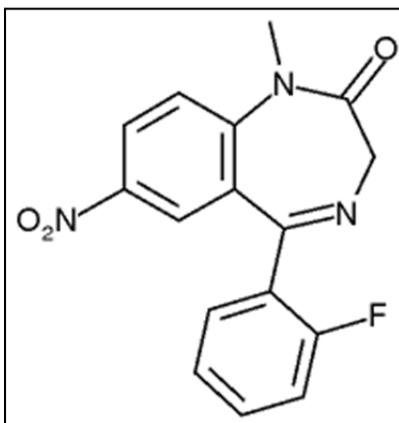


Figura 7.- Estructura del flunitrazepam.¹⁶

5.3.5 Farmacocinética de las benzodiazepinas.

- Absorción y biodisponibilidad.

Las benzodiazepinas tienen, en general, una fácil absorción en las primeras porciones del aparato digestivo y alcanzan su máxima concentración plasmática al cabo de 2-4 horas. Existen, sin embargo, diferencias en la rapidez de absorción. La toma de estos fármacos con el estómago vacío facilita la absorción mientras que su administración junto con antiácidos que contengan aluminio o con fármacos que retrasen el vaciado gástrico reduce la velocidad de absorción.^{11, 12}

- Distribución.

El volumen de distribución depende sobre todo de la lipofilia de las moléculas de benzodiazepinas, ya que se establece un equilibrio dinámico en función de la afinidad por los distintos tipos de tejido (el cerebro tiene un alto componente de lípidos) y de la velocidad de metabolismo y eliminación. Tras una dosis única.^{11, 12}

- Metabolismo

Después de ser absorbidos y distribuidos, inmediatamente experimentan el efecto del primer paso, refiriéndose a que el fármaco pasa por primera vez al hígado realizando un metabolismo sustancial, inclusive antes de llegar a la circulación sistemática, debido a esto la concentración sanguínea del fármaco activo disminuye y la producción de muchos metabolitos inactivos. Debido a su liposolubilidad, las benzodiazepinas no son excretadas tal y como fueron administradas, para que esto suceda, se deben de metabolizar (sufrir una serie de cambios). Los derivados que se encuentran presentes en la orina, en su mayor parte son conjugados con ácido glucurónico o con iones de sulfato, los cuales carecen de actividad farmacológica. Los sistemas enzimáticos microsomales del hígado que participan en la metabolización de los medicamentos, son los que contribuyen en la depuración o eliminación de todas las benzodiazepinas.^{11, 12}

- Excreción y eliminación

Al terminar la biotransformación del principio activo, da comienzo el proceso de excreción de los metabolitos. Así que cuando los fármacos son solubles en agua o se hacen hidrosolubles por el metabolismo, como es el caso de las benzodiazepinas, estos se eliminan del cuerpo por medio de la orina; una característica que no es trascendente pero no por ello deja de ser importante para mencionarlo; es cuando el líquido es excretado por el riñón y presenta un pH ácido, se elimina el fármaco básico; en caso de que el pH sea básico la eliminación será de un fármaco básico.^{11, 12}

- Reacciones adversas e interacciones

Los efectos secundarios más frecuentes que pueden aparecer con el uso o administración de benzodiazepinas incluyen:

- a) Somnolencia, vértigo, Malestar estomacal,
- b) Visión borrosa y otros cambios en la visión,
- c) Dolor de cabeza, confusión, depresión, trastornos de la coordinación,
- d) Trastornos del ritmo cardíaco, temblor, debilidad, amnesia anterógrada, efecto resaca (tambaleos), sueños inusuales o pesadillas, dolor de pecho, (figura 8)

5.3.6 Farmacodinamia de las benzodiazepinas

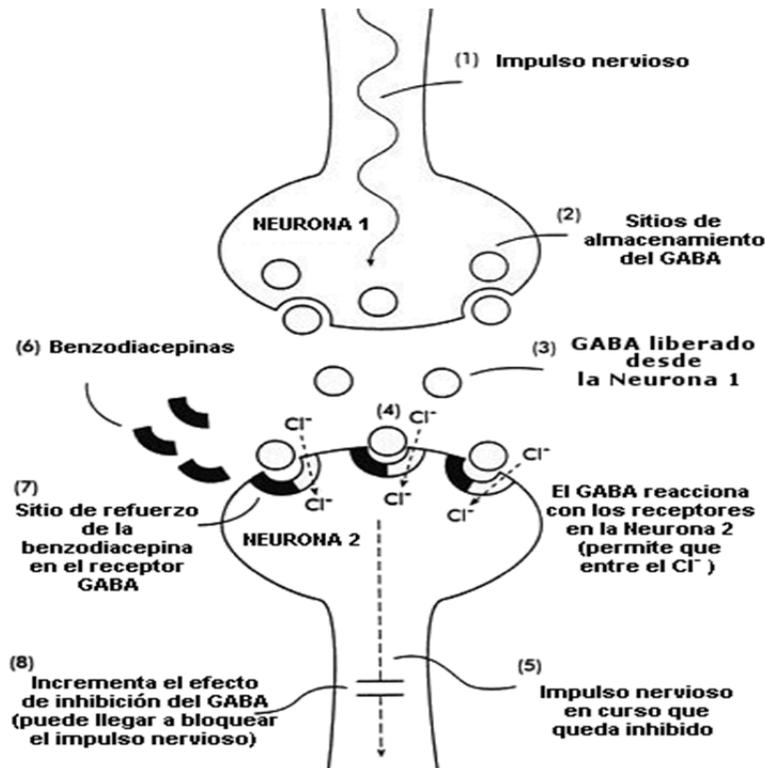


Figura 8.- Diagrama del mecanismo de acción del neurotransmisor natural GABA (ácido gamma-aminobutírico) y de las benzodiazepinas en Las células del sistema nervioso (neuronas) en el cerebro. ^{12,13}

El Impulso nervioso (1,2) que hace que el GABA sea liberado de los sitios en que está almacenado en la neurona 1 (3). El GABA liberado en el espacio interneuronal (4). El GABA reacciona con los receptores de la neurona 2; la reacción permite la entrada de los iones de cloruro (Cl⁻) en la neurona (5). Este efecto inhibe o detiene el progreso del impulso nervioso (6,7). Las benzodiazepinas reaccionan con el sitio de refuerzo de los receptores GABA (8). Esta acción aumenta los efectos inhibitorios del GABA; el impulso nervioso en curso puede quedar bloqueado completamente.

La forma en que el GABA transmite su mensaje inhibitorio es a través de lo que podríamos llamar un inteligente dispositivo electrónico. Su reacción con los sitios especiales (receptores

GABA) ubicados en la parte exterior de la neurona que lo recibe abre un canal, permitiendo así que las partículas con carga negativa (iones de cloruro) entren en la neurona. Estos iones negativos "sobrecargan" la neurona, debilitando la respuesta de la misma a otros neurotransmisores que, en condiciones normales, la excitarían. Las benzodiazepinas también reaccionan en sus propios sitios especiales (receptores benzodiazepínicos) que precisamente están ubicados en los receptores GABA. La combinación de una benzodiazepina con su receptor potencia la acción del GABA, lo cual permite que entre en las neuronas una mayor cantidad de iones de cloruro, aumentando así la resistencia de la neurona a la excitación. Los distintos subtipos de receptores benzodiazepínicos tienen acciones levemente distintas. Uno de estos subtipos, (el alfa 1) es el responsable de los efectos sedativos, otro (el alfa 2) es el que ejerce efectos ansiolíticos, mientras que ambos, el alfa 1 y el alfa 2, como también el alfa 5, son los responsables de los efectos anticonvulsivos. Todas las benzodiazepinas se combinan, en mayor o menor grado, con todos estos subtipos y todas aumentan la actividad del GABA en el cerebro. (figura 8)

Como resultado de este incremento de la actividad inhibitoria del GABA causada por las benzodiazepinas, disminuye la producción cerebral de neurotransmisores excitativos, incluso se reduce la producción de norepinefrina (noradrenalina), serotonina, acetil-colina y dopamina. Estos neurotransmisores excitativos son necesarios para las funciones involucradas en el estado normal de vigilia y alerta, memoria, tono muscular y coordinación, respuestas emocionales, secreciones de las glándulas endocrinas, control del ritmo cardíaco y de la tensión sanguínea y para muchas otras funciones, todas las cuales pueden ser perjudicadas por las benzodiazepinas. Hay otros receptores benzodiazepínicos, no relacionados con el GABA, que se encuentran en el riñón, colon, células sanguíneas y corteza suprarrenal, y que pueden ser afectados por algunas benzodiazepinas. Estos efectos directos e indirectos son responsables de los bien conocidos efectos adversos causados por el uso de las benzodiazepinas.^{8, 9,12, 15}

5.3.7 Aspectos legales.

En México, las personas que sean sorprendidas consumiendo o portando cualquier sustancia prohibida cuya cantidad se considere como de estricto consumo personal, no pueden ser sujetas a ningún proceso judicial. Lo contrario es una violación de lo establecido por la legislación penal mexicana en materia de delitos contra la salud.¹⁴

Además del tráfico, lo que se castiga en nuestro país es la producción, (esto es, la manufactura, fabricación, elaboración, preparación o acondicionamiento de algún narcótico), el transporte, el tráfico, el suministro gratuito, la prescripción y el comercio (esto es, vender, comprar, adquirir o enajenar algún narcótico). También se imponen penas a quienes aporten recursos o colaboren financieramente en los delitos anteriores, a quienes siembren o permitan que se siembre en terrenos de su posesión alguna planta cuyo alcaloide esté prohibido y realicen actos de publicidad o propaganda para favorecer el consumo de narcóticos.^{14, 20}

La Ley General de Salud en el Capítulo IV, Medicamentos en el artículo 226, indica lo siguiente: Los medicamentos, para su venta y suministro al público en el caso del rofinol (con flunitracepam como principio activo) está considerado dentro del grupos II. Los medicamentos psicotrópicos de este grupo, requieren para su adquisición receta médica que contenga impresos (imprenta) nombre, dirección, número telefónico, número de cédula profesional del médico que la expida, con fecha y firma del mismo. La receta deberá retenerse en la farmacia que surta, sellarla y registrarla en los libros de control autorizados por la Secretaría de Salud, que al efecto se lleven, se sella y se archiva en orden alfabético y número progresivo. Podrán prescribir dos presentaciones comerciales comunes del mismo producto como máximo, especificando su contenido y tendrá vigencia de treinta días a partir de la fecha de elaboración.^{14,19}

5.4.- PRUEBAS PRESUNTIVAS.

5.4.1 Pruebas cualitativas o colorimétricas.

Las pruebas presuntivas ayudan a dirigir la búsqueda analítica; una de ellas es a través de pruebas colorimétricas ya que multitud de sustancias dan lugar a una coloración cuando se mezcla con ciertos reactivos químicos. En algunas ocasiones el color puede ser específico de un compuesto, pero la mayor parte de los casos, la reacción es producida por varios compuestos clasificados en un determinado grupo en función a su estructura química. El color puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y de la cantidad de la muestra y la presencia de sustancias extrañas.^{23,24,17}

Cuando la sustancia contiene más de una sustancia o la droga es coloreada se puede obtener una mezcla de colores, por lo que es aconsejable realizar una separación cromatográfica y posteriormente la reacción colorida con los reveladores adecuados.^{23,24}

- **Prueba Bratton Marshall.**

El principio consiste en que la amina presente en la benzofenona derivada de la hidrólisis de la benzodiazepina, se pueda diazotizar usando ácido nitroso (preparado a partir del nitrito de sodio y de ácido clorhídrico). La sal de diazonio formada se hace reaccionar con el clorhidrato de N-1-naftiletildiamina para formar un compuesto azo.^{23, 24}

- **Cromatografía en capa fina.**

La hidrólisis de la mayoría de las benzodiazepinas y su conjugado da lugar a benzofenonas que pueden extraerse y analizarse por cromatografía en capa fina y confirmar su presencia utilizando patrones de referencia para la identificación.^{23,24}

- **Métodos de inmunoensayo.**

Los ensayos inmunológicos (EI) constituyen uno de los métodos que se emplean con frecuencia para fines de detección. En este tipo de ensayos el metabolito del fármaco

presente en la muestra del paciente compite contra un fármaco marcado por un número limitado de sitios de enlace en los anticuerpos específicos para el fármaco que se está analizando; el fármaco marcado en el ensayo inmunológico lleva un radio isótopo, una enzima o un compuesto fluorescente. Los ensayos inmunológicos incluyen ensayos radioinmunológico (RIA), técnica de ensayo inmunológico por multiplicación enzimática (EMIT) y ensayo inmunológico por polarización fluorescente (FPIA).^{23, 24,25}

5.5.- PRUEBAS CONFIRMATIVAS.

Una de las pruebas confirmativas por excelencia es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (CLAR-EM).

Otra técnica que permite separar e identificar de forma confiable compuestos volátiles, como medicamentos, pesticidas, contaminantes orgánicos ambientales, entre otros, sin embargo existe la posibilidad de derivatizar compuestos poco volátiles para poder analizarlos por este medio. Se dispone de una librería que identifica los compuestos directamente por su espectro de masas, principalmente medicamentos.^{18,22}

5.5.1 Pruebas cuantitativas.

Las técnicas de análisis cromatográfico ofrecen una gran posibilidad para la realización de análisis cuantitativo. La cromatografía permite separar mezclas muy complejas de productos, aun cuando estos sean de naturaleza muy semejantes, lo que permite un análisis directo de muestra que de otra manera sería muy difícil de cuantificar.²³

Las distintas técnicas cromatográficas se pueden dividir según cómo esté dispuesta la fase estacionaria:

- Cromatografía plana. La fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre un papel. Las principales técnicas son:
 - Cromatografía en papel
 - Cromatografía en capa fina

- Cromatografía en columna. La fase estacionaria se sitúa dentro de una columna. Según el fluido empleado como fase móvil se distinguen:
 - Cromatografía de líquidos
 - Cromatografía de gases
 - Cromatografía de fluidos supercríticos

La cromatografía de gases es útil para gases o para compuestos relativamente volátiles, lo que incluye a numerosos compuestos orgánicos.

Dentro de la cromatografía líquida destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography), que es la técnica cromatográfica más empleada en la actualidad.^{24,25,26}

5.5.2 La cromatografía de líquidos.

Como su nombre indica, en la cromatografía líquida (LC) la fase móvil es un líquido. El gran poder de la cromatografía líquida reside en la combinación de un amplio intervalo de posibles propiedades para la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fase estacionaria, significativamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores.²⁷

La cromatografía líquida trata una gran cantidad de combinaciones y muchas de ellas se clasifican con más de un nombre. Por ejemplo una de las primeras clasificaciones de la cromatografía se refiere a la forma física global de la fase estacionaria; así, tendríamos cromatografía en columna, cromatografía en capa fina y cromatografía líquida capilar. Otra nomenclatura se basa en la dirección del flujo de la fase móvil: cromatografía ascendente, cromatografía descendente y cromatografía en lecho plano. Otra clasificación se basa en la eficiencia de la separación; así hablaríamos de cromatografía líquida de alta resolución o cromatografía de capa fina de alta resolución.²⁸

Los diferentes tipos de cromatografía líquida también se clasifican atendiendo a fase de interacción son: de fase normal, de fase reversa, de intercambio iónico y de filtración en gel.²⁸

La cromatografía líquida de alta eficacia, a menudo llamada por su abreviatura, HPLC (del inglés, high performance liquid chromatography), correspondiendo a Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) del español, constituye una técnica analítica de uso muy

generalizado. Deriva de una evolución de la cromatografía preparativa en columnas cuyos resultados, en términos de selectividad y de resolución, han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas.²⁸

Estas fases, constituidas generalmente por micropartículas esféricas cuyo diámetro está comprendido entre 2 y 5 μm , produce una pérdida de presión importante en la columna. Por lo tanto, es necesario aplicar una fuerte presión a la fase móvil para obtener un caudal conveniente. Para destacar esta particularidad de la técnica, la letra P de las siglas HPLC, durante mucho tiempo, ha correspondido a la palabra presión.²⁸

La cromatografía de líquidos de alta resolución como tal actualmente representa el análisis cuantitativo al representar la señal de la concentración frente al tiempo de retención.^{28, 27}

La instrumentación de cromatografía líquida en general está constituida de los siguientes elementos, (figura 9).

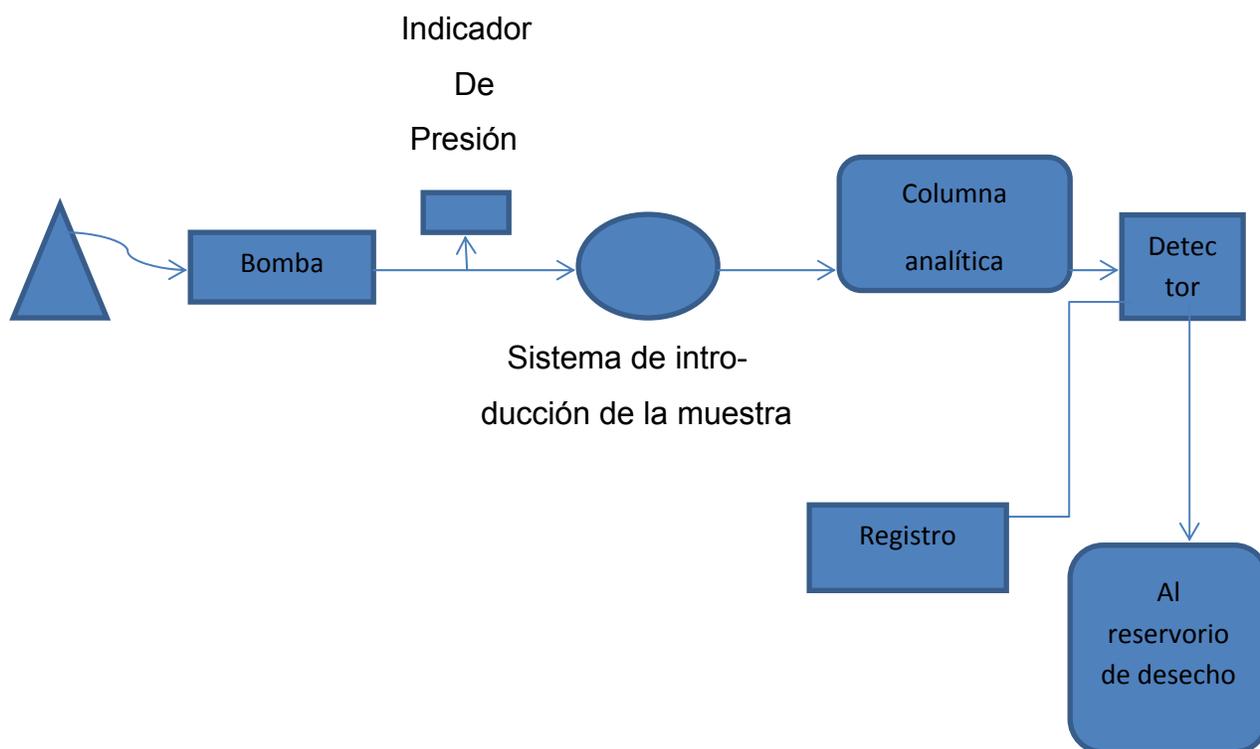


Figura 9.- Diagrama de flujo de un cromatógrafo de líquido sencillo.²⁹

- a) Bomba: Su principal función es mantener el caudal de la fase móvil constante es decir estable a través de un equilibrador mecánico.
- b) Sistema de introducción de la muestra: Permite aplicar un volumen preciso de muestra en un corto periodo de tiempo y perturbar lo menos posible la circulación.
- c) Columnas para cromatografía líquida: son tubos de acero inoxidable con paredes muy gruesas, empacadas con gel de sílice que se encuentra contenida entre dos discos porosos, siendo esta la fase estacionaria.
- d) Detección en cromatografía líquida. Cualquier tipo de detector debe reunir un cierto número de cualidades; dar a cada compuesto detectado una respuesta proporcional a su concentración instantánea, ser sensible y tener poco ruido de fondo, ser estable en el tiempo. Los modos de detección más corrientes se basan en propiedades ópticas de los compuestos: absorción, voltimetría, fluorescencia e índice de refracción.
- e) Registro de cromatogramas. Para todos los detectores que se usan en cromatografía, al menos sobre un número razonable de los mismos, existe una relación lineal entre el área bajo el pico y la cantidad de sustancia que es responsable de causar este pico. Por tanto, por inyección de cantidades apropiadas de analito puro, se puede trazar una curva estándar para dicho analito. Esta curva se puede usar para buscar la concentración desconocida.^{30,31}

El éxito en la aplicación correcta de esta técnica para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: el tipo de columna, la fase móvil y de los platos teóricos.

La migración diferencial en la cromatografía de líquidos de alta resolución o de alta presión es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre fase estacionaria y fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil y en que emigraron, hacia un detector donde se registran sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo puede emplearse para identificar el

compuesto. Este tiempo de retención (**RT**), se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma. ^{30, 32}

Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria dan lugar a los diferentes métodos de cromatografía esto es líquido-líquido o de partición. ^{27, 28, 30}

Los parámetros que hay que considerar para que se lleve una buena separación son:

- a) Tiempo muerto: es el intervalo de tiempo que transcurre desde que el trazador es insertado al principio del lecho cromatográfico hasta que sale del mismo o el tiempo de salida de una especie no retenida. ^{27, 28, 30}
- b) Tiempo de retención: Es el tiempo transcurrido entre el instante en que se introduce la mezcla y el instante en que se detecta la señal propia del componente en su máxima intensidad. ^{27, 28, 30}
- c) Factor de capacidad: Es el cociente de la cantidad de soluto en fase estacionaria entre la cantidad en fase móvil. ^{27, 28, 30}
- d) Número de platos teóricos. : se considera un sistema estático en equilibrio, en el cual el soluto recorre la columna mediante una serie de equilibrios, cada uno de los cuales se alcanza, en toda su extensión, en un segmento o porción de la columna, llamado plato teórico. ^{27, 28, 30}
- e) Resolución: es el parámetro que expresa el grado de separación que se puede obtener en un sistema cromatográfico para dos componentes dados. ^{27, 28, 30}

5.5.3 La espectrometría de masas.

La espectrometría de masas (EM) es un método de análisis que se basa en la determinación de masas de especies atómicas o moleculares individuales de la muestra analizada, lo que permite recabar información sobre su naturaleza, su composición y de igual modo sobre su estructura. Una cantidad muy pequeña del compuesto a analizar, bajo la forma más conveniente (gaseosa o similar), está ionizada: las especies portadoras de carga eléctrica resultante son sometidas a la acción de un campo eléctrico y/o magnéticos según el equipo.

El estudio de las trayectorias seguidas, en un recipiente sometido al vacío, permite determinar la relación masa-carga de los iones, así como, eventualmente, su naturaleza. Este método destruye el compuesto analizado, aun que sólo es necesaria una cantidad ínfima, pero muestra una gran sensibilidad.³⁰

En el espectro de masas el compuesto pasa por las siguientes etapas:

- 1.- Ionización: la especie estudiada es vaporizada y ionizada en la fuente del equipo por alguno de los muy numerosos procedimientos existentes. En este estado, todo compuesto formado por moléculas produce una mezcla estadística de iones de fragmentación.
- 2.- Aceleración: posteriormente, los iones son extraídos de la fuente, focalizados y acelerados por las lentes electrónicas para incrementar su energía cinética.
- 3.- Separación: los iones son filtrados siguiendo su relación masa/ carga por el analizador. Ciertos equipos combinan varios tipos de analizadores dispuestos en serie.
- 4.- Detección: después de la separación los iones terminan su recorrido chocando con un detector que amplifica la muy débil corriente eléctrica inicialmente originada.
- 5.- Obtención del espectro de masas: obtenido por tratamiento de la señal enviada por el detector.^{29,30}

5.5.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas (CLAR- EM).

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de masas abre una nueva perspectiva para los análisis espectrométricos eficientes, esta técnica puede ser utilizada potencialmente para medir un amplio rango de analitos, sin limitaciones de masa molecular, con una preparación de la muestra en forma simple, sin necesidad de una derivación química. Esta técnica permite la separación y detección de moléculas midiendo su peso electrónicamente y presentar los resultados en la forma de espectro de masas. Un espectro de masa es una gráfica que muestra cada molécula específica por peso y cantidad de moléculas presentes.³¹

Las grandes ventajas de utilizar este método como prueba confirmativa son:

- Es rápida y de excelente resolución.
- Permite la separación, identificación y cuantificación del analito.
- Requiere de poca muestra.
- No hay necesidad de una derivación.

Una vez que la muestra biológica fue sometida a un proceso de extracción, la detección por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de masas se realiza bajo las siguientes condiciones.³¹

5.5.5 Material y equipo.

Instrumentación.

Todas las mediciones se hacen en un LTQ-Orbitrap (Termo Fisher Scientific, Bremen, Germany) espectrometría de masas con sistema operativo de ionización positiva por electropulverización de iones (ESI) modo y equipado con una bomba cuaternaria.^{31,27}

Drogas de referencia y materiales.

7- Aminonitrazepam, 7-aminoclonacepam, 7-aminoflunitrazepam, bromazepam, alfa - hidroxialprazolam, nitrazepam, alfa-hidroxitriazolam, oxazepam, estazolam, nordiazepam, lorazepam, clonazepam, 2-hidroxietilflurazepam, alprazolam, triazolam, flunitrazepam, temazepam, etizolam, clotiazepam, delorazepam, clobazam, lormetazepam, diazepam, pinazepam, y prazepam. El estándar interno deuterado 7-aminoflunitrazepam-D₇, alfa-hidroxitriazolam-D₇, nordiazepam-D₅, y nitrazepam-D₅.

Todos los disolventes y químicos inorgánicos fueron de grado analítico. El agua fue de ultrapurificada y filtrada a través de un sistema de mili-Q Plus (Milipore, Bedford, MA, USA).

Las soluciones primarias (1 mg/mL) para cada analito fueron preparadas en metanol, la solución de benzodiazepinas (10 µg/mL) de todos los analitos fueron preparados en metanol; las soluciones de referencia trabajadas fueron preparadas diariamente, por subsecuentes diluciones en metanol, todas las concentraciones alcanzaron un rango de 1 µg/mL hasta 5 ng/mL. A la mezcla de estándar interno (10 µg /mL) fue preparada en metanol conteniendo 7-

aminoflunitrazepam-D₇, alfa-hidroxitriazolam- D₇, nordiazepam-D₅, y nitrazepam-D₅, para una solución (100 µg /mL) de cada estándar interno. Todas las soluciones fueron conservadas a -20°C. ^{27, 28,31}

5.5.6 Método.

Las muestras utilizadas como **blancos** de pelo estaban libres de drogas, café, eran cabellos negros de 20 individuos diferentes hombres y mujeres caucásicos que no usaban los medicamentos señalados.

La muestra utilizada como **solución patrón** para validar el método se recolectaron de personas que usan benzodiazepinas como agentes terapéuticos.

Las **muestras auténticas** donde se probó el método se tomaron en una clínica toxicológica y forense de 19 sujetos hombres y mujeres caucásicos en el protocolo de permisos para conducir y 3 casos de autopsia.

PREPARACION DE LA MUESTRA.

Las muestras de pelo fueron descontaminadas con un lavado en 2 mL de iso-octano seguido por 2 mL de acetona. Después del secado se cortaron en segmentos de 1-3 cm y pulverizado en un molino de bola.

EXTRACCION.

La extracción se realiza siguiendo esencialmente el enfoque de Villain ³³, una propuesta para benzodiazepinas e hipnóticos en cabello. De esta manera una alícuota de 50 mg, después de la adición de 10 microlitros de solución estándar interno en 1 microgramo/mL, fueron ultrasonificados por 1 hora, se incubaron durante la noche a 37°C en 1.5 mL de una solución amortiguadora de fosfato pH = 8.4, y se extrae con 5 mL diclorometano/dietil éter (90:10, v/v) por 15 minutos. Después se centrifuga y la fase orgánica se seca bajo una corriente de

nitrógeno, el residuo seco se disuelve en 50µL de fase móvil A (agua, 1.1% de ácido fórmico).
27, 28, 29 ,31

CONDICIONES DE LA CLAR-EM

La separación se realiza sobre una luna C18 (150 x 1 mm, 5 µg) con una columna analítica (Phenometex, Torrance, C.A, USA) con un flujo constante de 100 µL/min. La fase móvil de la cromatografía líquida fueron disolvente A (agua, 0.1% ácido fórmico) y disolvente B (acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico). La fase móvil se programa con las siguientes condiciones: inicia 10% B, gradiente lineal a 25% en 4 minutos, 25% B se mantiene de 4 a 7 minutos, posteriormente en rampa de 40% B por 5 minutos, a 60% B en 4 minutos, y a 90% de B en 2 minutos, 90% B se mantiene desde 18avo a 26avo minuto. Los tiempos de reequilibrio son de 5 minutos. La columna y las muestras fueron manteniéndose hasta una temperatura de 40°C y 20°C respectivamente.

El ion positivo de estándar interno los parámetros de voltaje de tensión capilar fueron de 25V, el gas alimentador (N₂) caudal 13 unidades arbitrarias, y temperatura capilar de 275°C.

El espectro total de masa fue adquirido en un rango de masa/carga (m/z) 120-500 usando un analizador de masa orbitrap operando con una tarjeta de masas con un poder de resolución de cerca de 60,000 (El ancho máximo y altura de pico se define en m/z 400) y un tiempo de análisis de 0.65 s. Dentro de los experimentos de colisión que se realizaron fueron conducidos a un voltaje de fragmentación de 20 V. La calibración de masas se realizo usando una mezcla de dodecil sulfato de sodio, taurocolato de sodio, el tetrapeptido MRFA (acetato de L-metionil-arginil-fenilalanil-alanina), y ultramark 1621.³¹

La detección de los análisis y el estándar interno fueron basados en los siguientes criterios:

- 1.- La masa media exacta de MH⁺ debe ajustarse a la masa exacta teórica con una tolerancia de masa fija de +/- 2 ppm.
- 2.- La abundancia relativa de los iones en el conjunto isotrópico medido coincide con los de la agrupación calculado isotópicamente dentro del +/-15%.
- 3.- Diagnostico de iones por fragmentos obtenidos en la fuente de experimentos de colisión debe estar presente en su abundancia relativa con respecto a ion MH⁺ que coincide con los patrones de calibración del estándar dentro del +/-15%.

4.- La ventana del tiempo de retención se estableció en +/-2% de un estándar de calibración.
30, 31

5.5.7 Resultados.

La separación cromatográfica se optimiza por inyección preparación de una columna analítica luna C18 (150x1.0mm, 5 µm). Después se optimizó el gradiente, tiempos de retención para el análisis de analitos y el estándar interno donde se estimaron seis réplicas de nivel de concentración (100 pg/mg) por día y en tres diferentes días. Los resultados se reportan en la tabla 6.

La confirmación de la identidad de los analitos se logra comparando el tiempo de retención, así como la identificación del ión molecular. En el espectro de masa, la identificación del ión molecular da inmediatamente la masa molecular del compuesto muestra.

El método analítico validado, fue aplicado a 19 casos de sujetos que solicitaron permisos de conducir, que eran sospechosos de estar vinculados con el consumo de benzodiazepinas por que una o mas muestras de orina se encontraron positivas usando una prueba inmunoquímica (EMIT II plus) para la clase benzodiazepinas y para 3 casos de autopsia.

Diez diferentes benzodiazepinas y tres metabolitos fueron detectados y dió positivo en 14 de 22 casos, ^{29, 31}

BENZODIACEPINA	COMPOSICIÓN ELEMENTAL (M)	MASA EXACTA	MEDIDA DE MASA	MEDIDA	ESTANDAR	TIEMPO DE			
		(MH ⁺), M/Z	(MZ ⁺), M/Z+/-ESTANDAR	DEL ERROR (PPM)	INTERNO	RETENCION (MINUTOS)+/-SD			
1	7-Aminonitrazepam	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O	252.11314	252.11301	±0.00008	0.5	Nitrazepam-D ₅	1.88	±0.04
2	7-Aminoclonazepam	C ₁₅ H ₁₂ ON ₃ Cl	286.07417	286.07407	±0.00005	0.3	Nitrazepam-D ₅	5.32	±0.09
3	7-Aminoflunitrazepam	C ₁₆ H ₁₄ ON ₃ F	284.11937	284.11918	±0.00006	0.6	7-Aminoflunitrazepam-D ₇	8.15	±0.09
4	Clordiazepoxide	C ₁₆ H ₁₄ ClN ₃ O	300.08982	300.08965	±0.00010	0.5	Nordiazepam-D ₅	9.21	±0.07
5	Midazolam	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃	326.08548	326.08535	±0.00004	0.3	α-Hydroxytriazolam-D ₄	10.44	±0.06
6	Flurazepam	C ₂₁ H ₂₃ ClFN ₃ O	388.15864	388.15853	±0.00001	0.2	7-Aminoflunitrazepam-D ₇	10.78	±0.04
7	Bromazepam	C ₁₄ H ₁₀ BrN ₃ O	316.008	316.00785	±0.000007	0.4	Nordiazepam-D ₅	12.55	±0.18
8	α-Hydroxyalprazolam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₄ O	325.08507	325.08505	±0.00004	0.1	α-Hydroxytriazolam-D ₄	16.14	±0.15
9	Nitrazepam	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₃	282.08732	282.08723	±0.00002	0.3	Nitrazepam-D ₅	16.14	±0.10
10	α-Hydroxytriazolam	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ O	359.04609	359.04617	±0.00005	-0.2	α-Hydroxytriazolam-D ₄	16.33	±0.18
11	Oxazepam	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	287.05818	287.05815	±0.00008	0.1	Nordiazepam-D ₅	16.70	±0.30
12	Estazolam	C ₁₆ H ₁₁ ClN ₄	295.0745	295.07443	±0.00015	0.2	α-Hydroxytriazolam-D ₄	16.79	±0.35
13	Nordiazepam	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O	271.06327	271.06329	±0.00006	0.1	Nordiazepam-D ₅	17.16	±0.09
14	Lorazepam	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	321.01921	321.01922	±0.00008	0.1	Nordiazepam-D ₅	17.33	±0.14
15	Clonazepam	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₃	316.04835	316.04826	±0.00004	0.2	Nitrazepam-D ₅	17.37	±0.10
16	2-Hydroxyethylflurazepam	C ₁₇ H ₁₄ ClFN ₂ O ₂	333.08006	333.07995	±0.00006	0.3	7-Aminoflunitrazepam-D ₇	17.46	±0.07
17	Alprazolam	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	309.09015	309.09007	±0.00009	0.2	α-Hydroxytriazolam-D ₄	17.51	±0.14
18	Triazolam	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₄	343.05118	343.05117	±0.00003	0.0	α-Hydroxytriazolam-D ₄	18.05	±0.29
19	Flunitrazepam	C ₁₆ H ₁₂ FN ₃ O ₃	314.09355	314.09347	±0.00007	0.2	7-Aminoflunitrazepam-D ₇	18.38	±0.18
20	Temazepam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	301.07383	301.0738	±0.00001	0.1	Nordiazepam-D ₅	18.64	±0.17
21	Etizolam	C ₁₇ H ₁₅ ClN ₄ S	343.07787	343.0778	±0.00006	0.2	α-Hydroxytriazolam-D ₄	18.69	±0.13
22	Clotiazepam	C ₁₆ H ₁₅ ClN ₂ OS	319.06664	319.06651	±0.00004	0.4	α-Hydroxytriazolam-D ₄	18.97	±0.08
23	Delorazepam	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	305.02429	305.02424	±0.00002	0.1	Nordiazepam-D ₅	19.02	±0.25
24	Clobazam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	301.07383	301.07375	±0.00005	0.2	Nordiazepam-D ₅	19.04	±0.25
25	Lormetazepam	C ₁₆ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₂	335.03486	335.03486	±0.00009	0.1	Nordiazepam-D ₅	19.29	±0.08
26	Diazepam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	285.07892	285.07883	±0.00001	0.3	Nordiazepam-D ₅	19.69	±0.10
27	Pinazepam	C ₁₈ H ₁₃ ClN ₂ O	309.07892	309.07873	±0.00009	0.6	Nordiazepam-D ₅	21.39	±0.04
28	Prazepam	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O	325.11022	325.11015	±0.00008	0.2	Nordiazepam-D ₅	22.49	±0.02
29	7-Aminoflunitrazepam-D ₇	C ₁₆ H ₇ D ₇ ON ₃ F	291.1633	291.16316	±0.00005	0.4	-	7.94	±0.15
30	Nitrazepam-D ₅	C ₁₅ H ₆ D ₅ N ₃ O ₃	287.1187	287.11874	±0.00008	-0.1	-	16.01	±0.11
31	α-Hydroxytriazolam-D ₄	C ₁₇ H ₈ D ₄ Cl ₂ N ₄ O	363.0712	363.0712	±0.00002	0	-	16.27	±0.15
32	Nordiazepam-D ₅	C ₁₅ H ₆ D ₅ ClN ₂ O	276.09465	276.09451	±0.00004	0.5	-	16.95	±0.20

Tabla 6.- Masa exacta, tiempo de retención y estándar interno para cada analito.

Usando CLAR-EM con una especificidad adecuada, se pueden lograr buenos resultados con un barrido completo, sin la necesidad de realizar múltiples experimentos de espectrometría de masas. La alta especificidad de la medición se debe principalmente a que permite la separación cromatográfica y la posterior ionización para su identificación siendo el tiempo de retención del analito, la medición exacta de iones MH^+ y el cromatograma los parámetros que permiten la identificación y cuantificación de forma confirmatoria (figura 10 y 11). El estudio también permitió la diferenciación de sustancias isoméricas como el temazepam y clobazam, la caracterización se logró utilizando energía de 20v como fuente de fragmentación, donde MH^+ de temazepam da un fragmento m/z de 255.06679, mientras que MH^+ del clobazam genera iones de m/z 259.06170. La figura 10 muestra el cromatograma obtenido por CLAR-EM para obtener una muestra de cabello.^{30, 31}

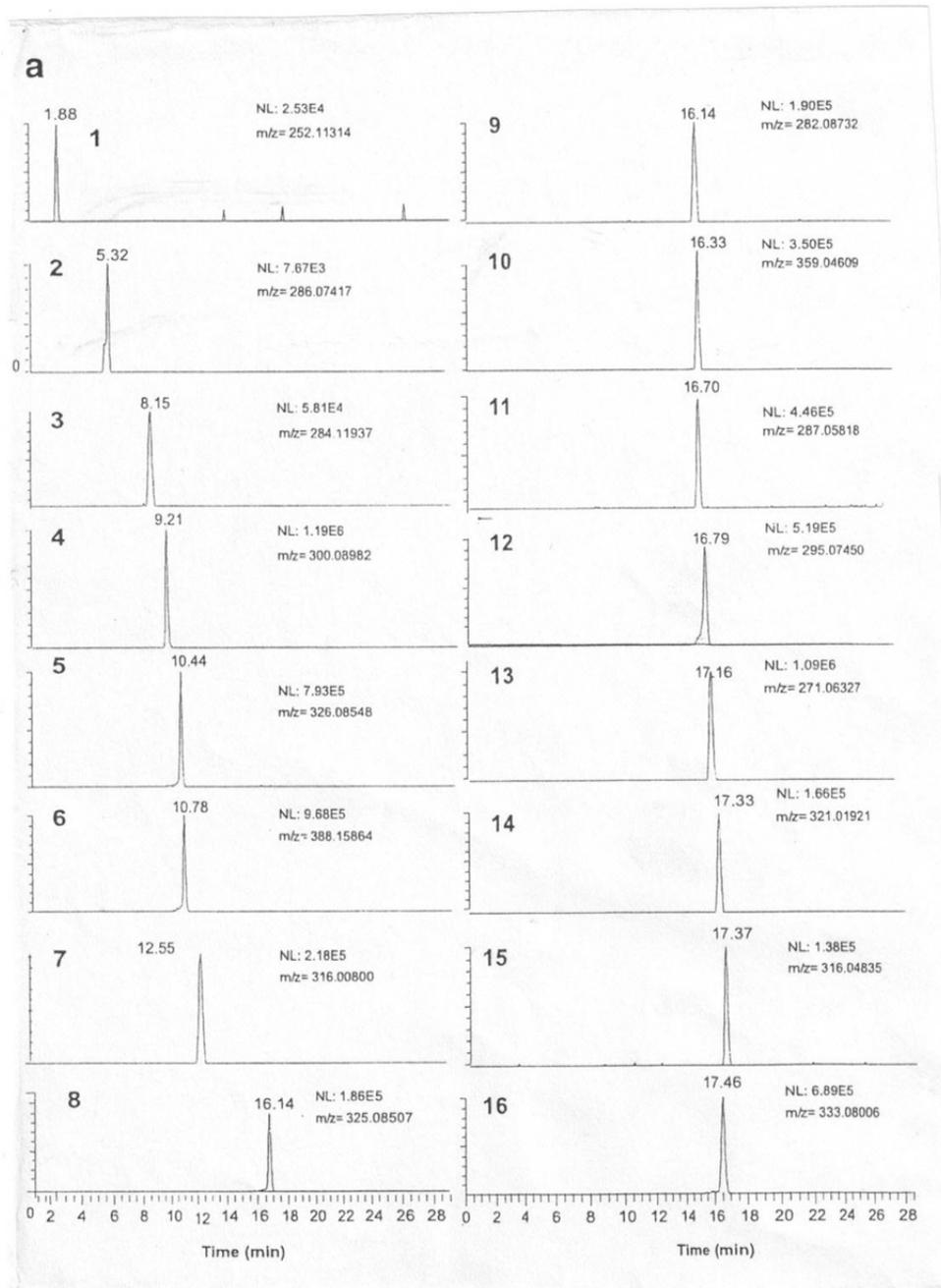


Figura 10.- CLAR-EM Cromatogramas de muestras de cabello enriquecido hasta 100pg/mg con benzodiazepinas 1-16 (a) o benzodiazepinas 17-28 (b); cromatogramas de estandar interno 1-4 también se incluyen.³¹

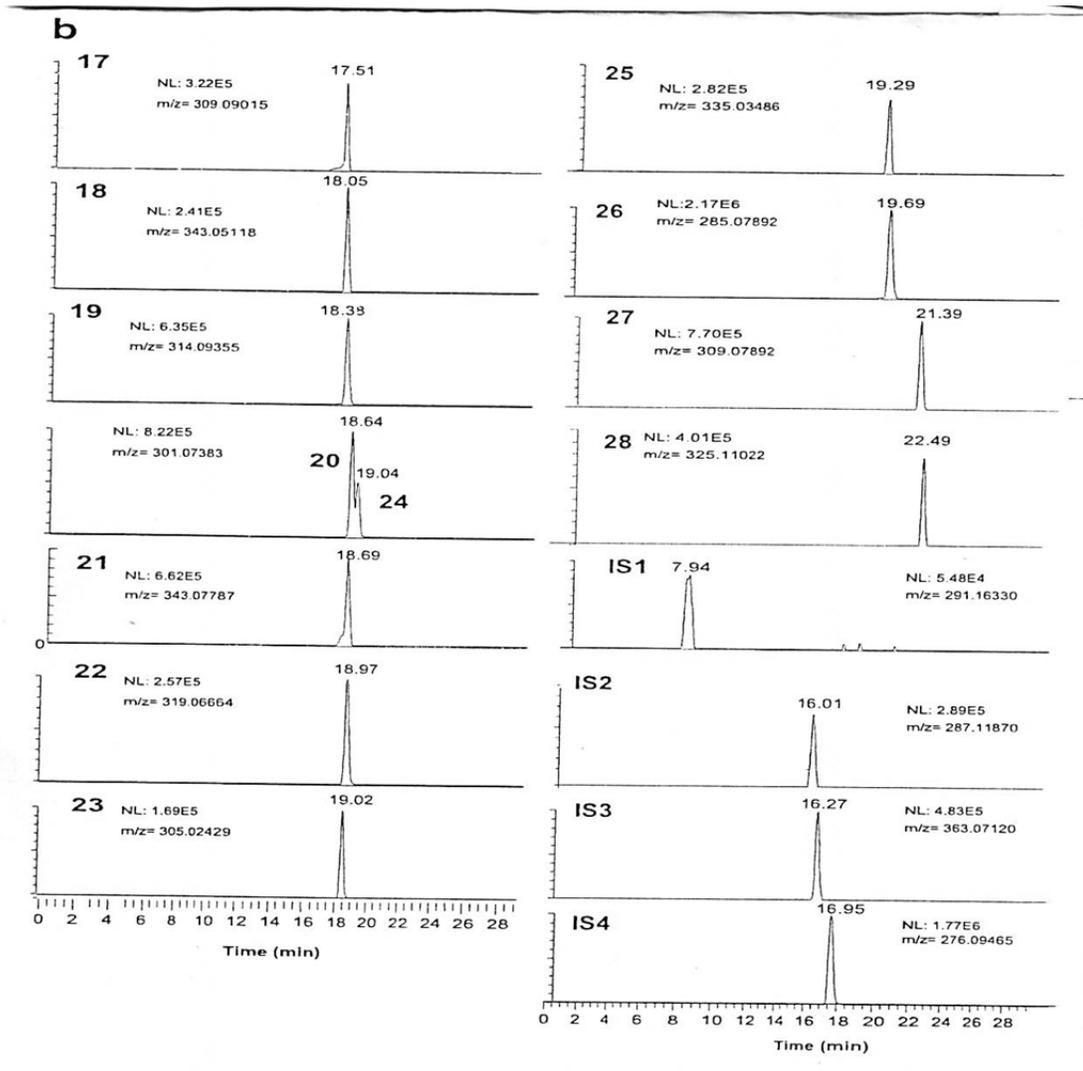


Figura 10.- CLAR-EM Cromatogramas de muestras de cabello enriquecido Hasta 100pg/mg con benzodiazepinas 1-16 (a) o benzodiazepinas 17-28 (b) cromatogramas de estandar interno 1-4 también se Incluyen.³¹

6.- ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En el año 2002 Kronstrand ³⁴ publicó un procedimiento analítico para la detección de siete benzodiazepinas y metabolitos asociados, utilizando CL-EM/EM, con los límites típicos de cuantificación de 25-125 pg/mg. En el 2005, Laloup³⁵ validó un método CL-EM/EM para la determinación simultánea de 26 benzodiazepinas en el cabello con límites de cuantificación que varían de 0.5-125 pg/mg; Villian ³³ realizó un procedimiento de 16 benzodiazepinas y los hipnóticos en pelo obteniendo los niveles mas bajos de cuantificación de 0.5 a 5 pg/mg.

La principal novedad del método propuesto es el uso de la espectrometría de masas de alta resolución con un orbitrap para la determinación simultánea de un gran número de benzodiazepinas en el cabello, siendo la cromatografía de líquidos de alta resolución el método mas selectivo por que este, está basado en barrido completo de mediciones de masa exacta de los fragmentos, de iones generados por la colisión.

El método puede ser utilizado tanto en la detección, identificación y confirmación de 28 compuestos benzodiazepinas incluyendo 6 metabolitos. El poder de resolución nominal fue de 60,000 con altura máxima de pico. Desafortunadamente para mantener la linealidad, la cantidad de muestra que se requiere es de 50 mg de muestra y el método ha sido validado por éste método. ^{31, 32}

La ventajas del método propuesto es proporcionar resultados precisos y exactos, reduce el tiempo de análisis, tiene una sensibilidad muy alta que permite la identificación y cuantificación de los metabolitos.

7.- CONCLUSIONES.

Con base a lo establecido en los objetivos de este trabajo se concluye lo siguiente:

- Estudiando la estructura, morfología y química del pelo, farmacología y toxicología de flunitrazepam fue posible proponer un método analítico que permite identificar y cuantificar 28 benzodiazepinas y metabolitos requiriendo 50 mg de muestra y los límites mas bajos de cuantificación son de 1 a 10 pg/mg, considerándose ya un método validado.
- Se destacó la importancia de relacionar el flunitrazepam con delitos sexuales y violentos, así mismo la importancia de la cadena de custodia en el manejo de indicios filamentosos.
- Esta técnica ya fue aplicada en muestras reales recolectadas con fines de toxicología clínica y forense, de sujetos que finalmente asumían haber tomado benzodiazepinas.
- Este estudio permite proporcionar resultados confiables, para ser aplicados en el ámbito forense.
- Cabe destacar la importancia de la cadena de custodia en el manejo de indicios, para la confiabilidad y validez de los resultados, siguiendo el protocolo que garantiza la integridad de la muestra
- Finalmente se concluye que la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas (CLAR-EM) es de gran utilidad en la separación, identificación y cuantificación de Flunitrazepam en pelo teniendo ya aplicación en delitos sexuales y forenses.

8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Fernández AP. Los Delitos Sexuales, Relacionados con Educación de Género. Gaceta UNAM. (3657). Pp. 11-12.
2. Jiménez NR. Estudio Criminalística de Pelos y Fibras. 1ª ed. México D.F; **1981**. Pp. 13-130.
3. Rico MG. Pelos y Fibras Metodología Científica. 1ª ed. México D.F; **1987**. Pp. 19 – 219.
4. Katzung BG. Farmacología Básica y Clínica. 7a ed. México D:F: Manual Moderno; **2010**. Pp 175-182, 378-390.
5. Manual de Toxicología Clínica, Prevención, Diagnóstico y Tratamiento. 6ª ed. México DF: Manual Moderno; **1999**. Pp. 148-154.
6. Schnak AH. El comportamiento del consumidor, 1ª ed. Mexico D.F; **2010**. Pp. 155-156.
7. Nahas, G.G. Manual de toxicomanías. Barcelona ; **2005**. Pp. 65-75.
8. Zoja LG. Drogas, Adicción e Iniciación: La Búsqueda Moderna del Ritual. Barcelona. Paidos; **2009**. Pp. 145-151.
9. Moizeszowicz J, Psicofarmacología, Psicodinámica II. Aspectos Neuroquímicos, Neuropsiquiátricos y Psicológicos. México D.F: Paidos; **2005**. Pp. 162-192.
10. Ride JM, Martí TJ; Pons BR. Psiquiatría Forense. México D.F: Salvat; **2006**. Pp. 78-84.
11. Rang HP. Farmacología. 2a ed. Madrid: Churchill Livingstone; **2006**. Pp. 650-655.
12. Velásquez MJ. Farmacología. 12a ed. Madrid: McGraw-Hill; **2007**. Pp. 317-335.
13. Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapeutica, 12ª edición. Mc Graw-Hill; **2012**. Pp. 139-162.
14. Fernandez LP. Drogodependencia: Farmacología, Patología, Psicología, Legislación. Madrid. Medica Panamericana. **2009**. Pp. 144-163.

15. Cabrera J, Cabrera R. Aspectos Toxicológicos de las Benzodiazepinas y su Tratamiento. *Phronesis* Vol 11 No. 3; **2010**. 53-101.
16. Córdoba. Toxicología. Bogotá: Manual Moderno. **1999**. Pp. 2-23, 48-60, 416-427.
17. Salve ML, Amich S, Laboratorio Bioquímico Clínico. Madrid; Interamericana-McGraw Hill; **1994**. Pp. 463-485.
18. Pesce JA; Kaplan LA. Métodos de Química Clínica. Buenos Aires; Medica Panamericana; **1991**. Pp. 638-653.
19. Vargas AE. Medicina Legal. México D.F: Trillas; **1996**. Pp. 124-135.
20. Pablo CM. Las Drogas y sus Efectos. México. Trillas. **2009**. Pp 63-74.
21. National Institute of Drug Abuse. (sede web) 8 Diciembre **2008**. Benzodiazepines. Disponible en :<http://www.nida.nih.gov/onfofax>.
22. Kenneth GF. Trends in Techniques for the Extracción of Drugs and Pesticides from Biological Specimens Prior to Chromatographic Separation and Detection: *Anal. Toxicol.* **1991**; 15: 71-81.
23. Pruebas para la Detección de Drogas. (sede web) diciembre 9 **2008**. Detección de Drogas en Muestras Biológicas. Disponible en: <http://diinsel.com/reporthtml>.
24. Martinez MC., Manual de Prácticas de Laboratorio de Toxicología. Unidad Docente Interdisciplinaria y Ciencias Químicas. Xalapa, **2000**.
25. Voguel J, Hednelt C., Detection of Drugs in Blood, Bile and Tissues with and Enzyme Immunoassay Technique: *J. Anal. Toxicol.* **1991**; 5: 307-309.
26. Salvatore JS. Benzodiazepines and GHB. Detection and Pharmacology. E.U.A: Humana Press; **2011**. Pp.1-57.
27. Rouessac F. Análisis Químico. Métodos y técnicas instrumentales modernas. Madrid; Mc Graw Hill. **2010**; Pp.301-340.
28. Bender GT. Métodos Instrumentales de Análisis en Química Clínica; Zaragoza; Acribia, S.A; **1992**; Pp. 187-209.
29. Rubinson KA: Análisis Instrumental. Madrid; Prentice Hall. **2011**. Pp 521-678.

30. Niessen WM. Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Boston; Taylor&Francis Group; **2006**; Pp 53-169.
31. Vogliardi S. Simultaneous LC-HRMS Determination of 28 Benzodiazepines and Metabolites in Hair: *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**; 400:51-67.
32. Jihyun K. Validation of a Simultaneous Analytical Method for the Detection of 27 Benzodiazepines and Metabolites and Zolpidem in Hair Using LC-MS/MS and its Application to Human and Rat hair: *Forensic sci. Int.* **2008**; 200: 70-80.
33. Villain M, Concheiro M, Cirimele V, Kintz P. 2005. Screening Method for Benzodiazepines and Hypnotics in Hair at pg/mg Level by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry. *J. Cromatogr B.* **2005**; 825: 58-67.
34. Kronstrand R, Nyström I, Josefsson M, Hodgins S. Segmental Ion Spray LC-MS-MS Analysis of Benzodiazepines in Hair of Psychiatric Patients. *J Anal. Toxicol.* **2002**: 26. 479-484.
35. Laloup M, Del Mar M, De Boeck G, Wood M, Maes V, Samyn N. Validation of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of 26 Benzodiazepines and Metabolites, Zolpidem and Zopiclone, in Blood, Urine and Hair. *J. Anal. Toxicol.* **2005**; 29: 616-626.
36. Tortora G. Principios de Anatomía y Fisiología. Bogotá; Panamericana. **2010**. Pp. 154-156.
37. Tresguerrea A. Atlas de anatomía Humana. Madrid; Mc Grall Hill. **2009**; Pp. 23-28.
38. Morrison R. Química Orgánica. Madrid. Iberoamericana. **2010**;124-125.