

69  
24.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

IDENTIFICACION DEL PRINCIPAL METABOLITO  
DE LA MARIHUANA EN ORINA POR  
CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :  
ALMA TOVAR GALVAN

A S E S O R :  
Q. F. B. ELIZABETH TORIZ GARCIA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1997



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE  
EXÁMENES PROFESIONALES

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FEB-CUAUTITLÁN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Identificación del principal metabolito de la Diazepam  
ovina por cromatografía de capa fina"

que presenta la pasante: Alma Tovar Galván  
con número de cuenta: 8154855-2 para obtener el TÍTULO de:  
Química Farmacéutica Básica

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 21 de Enero de 1997

PRESIDENTE	<u>D.F.B. Maricela Noé Martínez</u>	
VOCAL	<u>D.F.B. Elizabeth Toriz García</u>	
SECRETARIO	<u>D.F.B. José A. Garduño Rosas</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>D.F.B. Virginia Olivia Anellano</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>D.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera</u>	

**AGRADECIMIENTOS**

**A DIOS :**

POR LAS BENDICIONES QUE ME HA DADO DURANTE TODA MI VIDA,  
Y EN ESPECIAL POR ESTE MOMENTO.

**A LA PROFESORA Q.F.B. ELIZABETH TORIZ GARCIA :**

POR SU CONFIANZA Y AYUDA PARA REALIZAR ESTE TRABAJO.

**A MI QUERIDO AMIGO :**

Q.F.B. ANTONIO OLALDE TERREZ, POR LA INMENSA AYUDA QUE ME  
BRINDO PARA LLEVAR A CABO ESTE TRABAJO.

**DEDICO ESTA TESIS :**

**A MIS PADRES :**

CON INFINITO AMOR Y AGRADECIMIENTO, YA QUE CON SU APOYO Y EJEMPLO, HE LLEGADO A REALIZAR LA MAS GRANDE DE MIS METAS, QUE CONSTITUYE LA HERENCIA MAS VALIOSA.

**A MIS HERMANOS :**

ALEJANDRO, LUPITA, PABLO, ARTUPO Y MARITZA, POR SU CARIÑO Y APOYO.

EN FORMA ESPECIAL A RAYMUNDO Y ALICIA, POR SUS ENSEÑANZAS Y LA VALIOSA AYUDA QUE ME BRINDARON PARA LA CULMINACION DE ESTE TRABAJO.

**A MIS SOBRINOS :**

ALEJANDRO, KAFEN, JESSICA, ARTUPO, ATZIN, PABLO, ALICIA Y LA BEBE, CON INMENSO CARINO.

**A MIS AMIGOS :**

DULCE, ADRIANA, CLARA, LETICIA, ANTONIO, RUBEN Y ARMANDO POR TODO LO QUE COMPARTIMOS.

**A HECTOR RAUL: POR LO QUE SIGNIFICA PARA MI.**

## I N D I C E

	Pag.
1. <b>Introducción</b>	1
2. <b>Antecedentes</b>	3
3. <b>Características Botánicas del Género <i>CANNABIS</i></b>	7
4. <b>Constituyentes Químicos de la <i>MARIHUANA</i></b>	11
5. <b>Farmacología de la <i>MARIHUANA</i></b>	14
6. <b>Metabolismo de la <i>MARIHUANA</i></b>	16
7. <b>Identificación de los Metabolitos en el Laboratorio</b>	20
8. <b>Objetivo</b>	25
9. <b>Diseño Experimental</b>	26
10. <b>Análisis de Resultados</b>	31
11. <b>Discusión</b>	35
12. <b>Conclusiones</b>	37
13. <b>Bibliografía</b>	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>11-OH-THC</b>	<b>11-hidroxi-Tetrahidrocannabinol</b>
<b>CBI-TRIAGGE</b>	<b>Inmunoensayo de Competición Enlazante</b>
<b>CI</b>	<b>Coficiente Intelectual</b>
<b><math>\Delta</math>-9-THC</b>	<b>Delta-9-Tetrahidrocannabinol</b>
<b>DAU</b>	<b>Drug Assay Urine</b>
<b>EIA-EMIT</b>	<b>Técnica del Inmunoensayo Múltiple</b>
<b>FPIA-ADx</b>	<b>Inmunoensayo de Polarización Fluorescente</b>
<b>G-6-P-D</b>	<b>Glucosa-6-Fosfato-Deshidrogenasa</b>
<b>GC</b>	<b>Cromatografía de Gases</b>
<b>GC-MS</b>	<b>Cromatografía de Gases con Detector de Espectrometría de Masas</b>
<b>HPLC</b>	<b>Cromatografía de Líquidos de Alta Presión</b>
<b>LI-ABUSCREEN ON TRACK</b>	<b>Inmunoensayo de Látex</b>
<b>NIDA</b>	<b>National Institute on Drug Abuse</b>
<b>RIA-COAT-A-COUNT</b>	<b>Radioinmunoensayo</b>
<b>SNC</b>	<b>Sistema Nervioso Central</b>
<b>THC</b>	<b>Tetrahidrocannabinol</b>
<b>THCOOH</b>	<b>Ácido Carboxílico 11-Nor-Delta-9-Tetrahidrocannabinol</b>
<b>THCOOH CONJUGADO</b>	<b>Ácido carboxílico 11-Nor-Delta-9-Tetrahidrocannabinol conjugado al Ácido Glucurónico</b>
<b>TLC-TOXILAB</b>	<b>Cromatografía de Capa Fina</b>

## 1. INTRODUCCION

Las drogas de abuso constituyen uno de los problemas más importantes y complejos en la actualidad. El fenómeno se presenta en casi todas las sociedades modernas y son los jóvenes quienes conforman los conglomerados mayoritarios de usuarios de drogas. Un reporte del National Institute on Drug Abuse (NIDA) de los Estados Unidos señala que en 1991 aproximadamente 74.1 millones de personas consumieron drogas ilícitas. La marihuana es una de las drogas de abuso usadas con mayor frecuencia; 19.5 millones usaron esta droga durante 1994 y aproximadamente 9.7 millones la utilizan al mes (34). Aunque en México las estadísticas son escasas, un informe de 1988 emitido en la primera Encuesta Nacional de Adicciones, indica que entre los 12 y 17 años de edad se adquiere el hábito de drogarse con marihuana (35).

En un esfuerzo por impedir el uso de drogas de abuso en el lugar de trabajo, se han puesto en marcha una gran variedad de programas de detección de drogas tanto a nivel gubernamental como en el sector privado. Es así como a personas de diferentes ámbitos (deportes, negocios, industria privada, fuerzas armadas y, principalmente, los implicados en alguna situación delictiva) se les ha practicado la prueba para la detección de drogas. La mayoría de estos programas involucran el envío de muestras a un laboratorio toxicológico donde son procesadas (17, 34).

Es en el laboratorio toxicológico donde se aplica la metodología necesaria para la identificación plena de las muestras positivas a alguna droga de abuso. El panel de pruebas utilizadas incluye dos principios:

**I. Inmunoquímico.** Basado en el inmunoensayo enzimático (EIA-EMIT y EZ-SCREEN) (3, 7, 8, 13, 15, 17, 22, 31, 34), inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA-ADx) (1), radioinmunoensayo (RIA-COAT-A-COUNT) (9, 26, 34), inmunoensayo de látex (LI-ABUSCREEN ON-TRAK) (34) y el inmunoensayo de competición enlazante (CBI-TRIAGE) (34).

**II. Cromatográfico.** Basado en la cromatografía de capa fina (TLC-TOXILAB) (7, 10, 13, 18, 22, 30, 34), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (22), cromatografía de gases (GC) (11, 19, 23) y la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) (2, 4, 9, 12, 23, 24, 27, 34, 37, 38).



Inicialmente, las muestras son ensayadas por algún método inmunoquímico dada la facilidad con que se realizan dichas pruebas y la alta sensibilidad que permite la detección del metabolito de la droga de abuso en unidades de nanogramos. Sin embargo, la principal desventaja de estas pruebas es que los anticuerpos utilizados pueden reaccionar en forma cruzada con compuestos urinarios endógenos produciendo resultados falso-positivos (17, 34). Por esta razón es aconsejable que la presencia de metabolitos de drogas de abuso sean confirmados por alguna otra técnica basada en un principio diferente: la cromatografía (17, 15).

De los métodos cromatográficos disponibles, el acoplado a la espectrometría de masas (GC-MS) es el de elección para la confirmación de los metabolitos de las drogas de abuso en orina y los demás fluidos corporales (2, 4, 9, 12, 23, 24, 27, 34, 37, 38). Desafortunadamente, debido al alto costo del equipo y a la necesidad de contar con el personal especializado en su manejo, muchos laboratorios toxicológicos no tienen acceso a dicha técnica para la confirmación rutinaria de las muestras positivas (17, 34).

De los restantes métodos cromatográficos, el de cromatografía de capa fina (TLC) tiene la ventaja de no requerir equipo costoso y sofisticado, ser sensible y específico además de tener la capacidad de detectar niveles bajos de los metabolitos de las drogas de abuso sin derivatizar (18, 22).

El propósito de la presente tesis es identificar la presencia del principal metabolito de *MARIHUANA*, en muestras de orina por cromatografía de capa fina. El estudio se realizó con muestras de orina proporcionadas por sujetos adictos y personas sospechosas de consumir marihuana. El estudio incluye muestras de orina negativas, positivas y de personas que se desconoce si consumen *MARIHUANA*.

## 2. ANTECEDENTES

El cultivo de **MARIHUANA** es probablemente uno de los más antiguos; se realiza con el propósito de obtener fibra (cáñamo), aceite, semillas utilizadas como alimento por el hombre, para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades (por sus propiedades terapéuticas) y por sus propiedades alucinógenas (33).

Los datos actuales señalan que el cultivo de **MARIHUANA** con propósitos de obtener fibra de cáñamo es muy remoto. Así, tenemos que existen muestras de esta fibra en China, con fechas que datan de 4000 años a. c., también hilo y cuerda de Turquestán de 3000 años a. c. y objetos fabricados con cáñamo en algunos lugares de Turquía a finales del siglo VIII a. c (28).

El valor del cáñamo en la medicina popular es muy difícil de distinguir dadas las propiedades alucinógenas que posee dicha planta. Sin embargo, el primer dato que se tiene del uso medicinal de esta planta es del emperador chino Shen Nung quien elaboró un herbario hace 5000 años donde recomendaba el uso de **MARIHUANA** para el paludismo, beriberi, constipaciones, dolores reumáticos, distracción continua y padecimientos femeninos. Hoa-Glio, otro antiguo herbario chino, sugería una mezcla de resina de cañamo y vino como analgésico para la cirugía. No obstante lo anterior, fue en la India donde la **MARIHUANA** se utilizó exhaustivamente en la medicina popular. Se creía que agilizaba la mente, prolongaba la vida, mejoraba el juicio, bajaba la fiebre, inducía el sueño y curaba la disentería. En la India, la obra médica Sushruta argumentaba que podía curar la lepra. El Bharaparakasha del año 1600 d. c., la describe como antiflemático, digestivo, capaz de afectar la bilis, astringente, que se podía prescribir para estimular el apetito, mejorar la digestión y afinar la voz. En este mismo país, se podía utilizar tanto para el control de la caspa como para el alivio de dolores de cabeza, manías, insomnio, enfermedades venéreas, tosferina, dolores de oído y tuberculosis. En algunas partes de Africa era estimada por aliviar la disentería, el paludismo, el ántrax y la fiebre. Aún hoy en día, los hotentotes y los mfengu la utilizan contra las mordeduras de serpiente y las mujeres sotho alcanzan un estado de estupefacción parcial fumando marihuana antes de dar a luz (28, 32, 33).

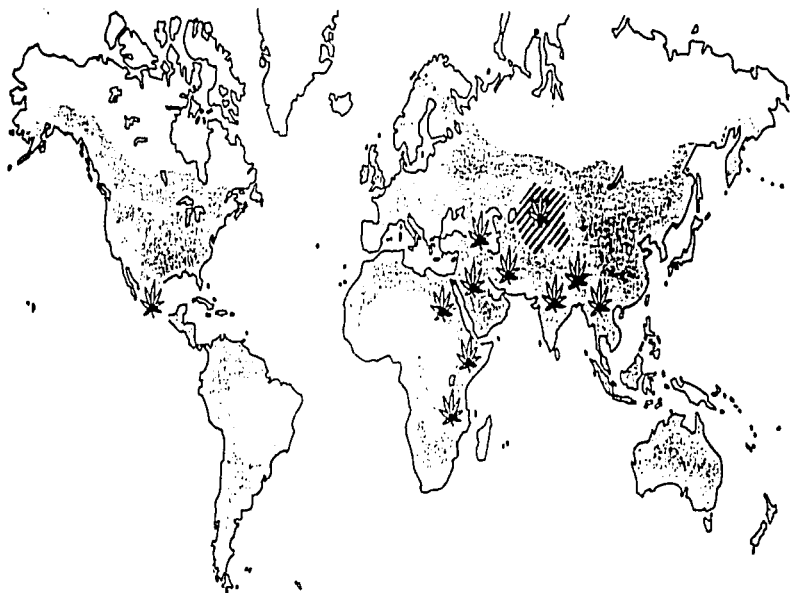
En la Europa medieval se le concedió un gran valor a la marihuana dentro de la medicina y sus usos terapéuticos se remontan hasta los primeros médicos clásicos como Dioscórides y Galeno. En los herbarios medievales se distingue entre el cáñamo cultivado y el cáñamo silvestre, recomendándose este último "contra bolas y quistes y otros tumores duros", mientras que el primero se utilizaba para curar diversos padecimientos que iban desde la tos hasta aliviar la ictericia. Sin embargo, prevenían contra el uso excesivo, ya que podía causar esterilidad y "secar las semillas de la reproducción" en el hombre (33).

El valor de la planta de *MARIHUANA* en la medicina popular ha estado obviamente relacionado con sus propiedades eufóricas y alucinógenas. El hombre primitivo en la búsqueda de plantas alimenticias, debe haber llegado a conocer los efectos alucinógenos del cáñamo y su intoxicación pudo haberlo inducido a otro plano, conduciendolo a creencias religiosas. De esta forma, la planta fue vista como un regalo de los dioses o un medio sagrado para comunicarse con el mundo de los espíritus. Una preparación llamada bhang era tan sagrada que se consideraba que podía disipar el mal, traer buena suerte y apartar al hombre del pecado. Aquellos que pisaban las hojas de esta planta sufrirían desastres; en cambio, se sellaban juramentos sagrados sobre el cáñamo. La bebida favorita de Indra, dios del firmamento estaba hecha de *MARIHUANA*. Por su parte, Shiva el dios hindú, ordenaba que durante la siembra al quitar la maleza y al cosechar esta planta, se cantara la palabra bhang repetidas veces (32, 33).

Es probable que las preparaciones de *MARIHUANA* hayan cobrado su máxima importancia como alucinógenos en un contexto religioso en los Himalayas de la India y en el altiplano del Tibet. Los tibetanos consideraban sagrada a la *MARIHUANA*. La tradición budista mahayana sostiene que durante los seis pasos de la vida ascética que conduce a la iluminación, Buda vivió a base de una semilla de cáñamo al día. También, en el budismo tántrico de los Himalayas tibetanos, la *MARIHUANA* tiene un papel muy importante en los rituales para facilitar la meditación profunda (28).

Aunque la planta *MARIHUANA* es hoy en día el alucinógeno más consumido en todo el mundo, su empleo como narcótico, excepto en Asia, parece ser no muy antiguo. Los efectos psicoactivos de las diferentes preparaciones de *MARIHUANA* varían mucho dependiendo de la dosis, la presentación, el tipo de planta utilizada, el modo de administración, la personalidad de quien la consume y los antecedentes culturales y sociales. Tal vez la característica más frecuente es un estado soñador. Se recuerdan eventos olvidados hace mucho tiempo y los pensamientos aparecen en secuencias aparentemente sin relación. La percepción del tiempo, y a veces del espacio, se ven alteradas. Las alucinaciones visuales y auditivas siguen al uso de fuertes dosis. Es típica la euforia, la excitación y la felicidad interior. En algunas ocasiones se puede experimentar un estado depresivo al final (33).

En los últimos años, el uso de la *MARIHUANA* se ha difundido mucho en la sociedad occidental y ha causado problemas sociales y de salud. Casi no hay acuerdo en cuanto a la magnitud de estos problemas y en cuanto a la solución. La opinión parece polarizarse en dos direcciones: aquella que considera el uso de la *MARIHUANA* como un peligro social, moral y físico por lo que debe ser prohibida; y aquella que plantea que su uso es inocuo, un pasatiempo placentero y que debe de ser legalizado.



Se cree que el lugar de origen de la Cannabis (área rayada) fue el Asia central, pero se la esparció por todo el mundo (área sombreada) con la excepción de las regiones Árticas, y las áreas de las selvas tropicales húmedas. La Cannabis se extendió desde tiempos remotos a África (excepto los trópicos húmedos) y fue rápidamente aceptada en las famosas especias nativas. Los españoles la llevaron a México y a Perú, los franceses a Canadá y los ingleses al este de Norteamérica. Había sido introducida a Europa del norte en tiempos de los vikingos. Probablemente los escitas fueron los primeros en llevarla a China.

### 3. CARACTERÍSTICAS BOTANICAS DEL GENERO *CANNABIS*

En la actualidad existe mucha confusión en cuanto al número de especies del género *Cannabis* (36). No obstante, las especies se pueden identificar por las características botánicas en cada una de las fases de crecimiento independientemente del tamaño y del sitio donde se desarrolla. En 1974 se presentó por parte de los taxonomistas de Estados Unidos (USA) un sistema de reconocimiento morfológico de las tres especies distintas: *sativa*, *indica* y *ruderalis* (21, 25).

En primera instancia se describirán las características botánicas de la especie *sativa* y posteriormente se indicarán las diferencias entre las especies para su identificación.

Las semillas de *Cannabis* germinan en un período de 3 a 7 días y su ciclo se completa en unos cuantos meses. La plántula posee dos hojas ligeramente desiguales en tamaño (1.0-1.6 cm) de forma lanceolada (aproximadamente tres veces más largas que anchas en su parte media), con tres nervaduras longitudinales en la cara superior de las hojas y pelos diminutos sólo visibles con aumento de 10X (cada uno con una base parecida a una pústula), mientras que en la parte inferior de las hojas existe una menor cantidad de pelos. Las hojas tienen bordes ligeramente dentados (aserrados) y están sostenidas por un tallo que llega a medir los 5 cm (21, 25).

Las hojas de la segunda generación de la plántula son mucho más grandes aunque tienen el mismo aspecto que las anteriores. Cada una tiene un tallo mayor (pecíolo) con tres hojas radiantes. Las hojas de la tercera generación tienen un pecíolo con 4 o 5 hojas radiantes por lo que se describen como digitadas, mientras que en la fase adulta de la planta la parte más alta del tallo puede tener hasta 11 hojas por pecíolo ordenadas en espiral (21, 25).

El pecíolo es angular y ocasionalmente hueco. Se cubre de pelos diminutos curvados hacia arriba que se presentan como si estuvieran abrazando al pecíolo, cada pelo está formado por una célula cuya base es ancha y de punta aguda. La base está constituida por cristolitos de carbonato de calcio con una apariencia de pequeña protuberancia (21).

Las hojas varían de tamaño de acuerdo a la madurez de la planta. A cada hoja le sobresale un peciolo delgado de unos 6 cm de largo con un surco en la parte superior, mientras que en la sección del tejido leñoso se observa una fibra en forma de herradura. Las hojas son delgadas y de textura suave, lanceoladas con los bordes aserrados (de 4-14 por lado) los cuales se dirigen hacia la punta de la hoja. También poseo nervaduras que salen oblicuamente de la mitad de la hoja hasta la punta de los dientes. Las hojas más largas llegan a medir los 15 cm de largo y tienen una gran cantidad de pelos diminutos en la parte superior (tricomas). No obstante, también en la parte inferior existen pelos abundantes y largos que miden entre 150-250 micras. Los tricomas tienen una base esférica y una punta muy corta que sobresale, mientras que la base de los pelos de la parte inferior de las hojas no es tan redonda (25).

Las flores crecen abundantemente en la parte inferior de la planta y tienen la característica de ser hermafroditas, es decir, macho por los estambres y hembra por sus pistilos. Sin embargo, la planta produce normalmente un tipo de flor por lo que se describen como plantas con órganos reproductores en plantas separadas. No obstante, suele presentarse que una misma planta produzca flores masculinas y femeninas; a estas plantas se les conoce como MONOICO. Cuando las plantas masculinas florecen, sus flores son más llamativas que las de las plantas femeninas que son más frondosas (21, 25).

Las plantas masculinas tienen las hojas mucho más separadas en las inflorescencias, además de que mueren más rápidamente que las femeninas por lo que son cosechadas muy tiernas y se utilizan para la producción de fibra o resina. Las inflorescencias masculinas crecen entre las ramas de las que tienen tallos individuales que llegan a medir los 18 cm de largo; estas se encuentran cubiertas de diminutos pelos ásperos. Cada flor consiste de 5 sépalos, los cuales tienen pelos muy pequeños cuyos colores varían del blanco al verde llegando a medir los 3.5 cm de largo y 5 estambres suspendidos en filamentos y anteras muy delgados, que se abren longitudinalmente desde la punta hasta abajo dejando caer el polen que es llevado por el viento hacia las flores femeninas. Los polen son de forma casi circular, ligeramente más anchos que largos midiendo de 25-30 micras, lisos con 2-4 poros circulares por polen (21, 25).

Las inflorescencias femeninas no se proyectan más allá de las hojas, son compactas, cortas y con pocas flores. La flor individual tiene un pequeño órgano de color verde, llamado bráctea, y algunas veces cáliz, el cual cubre completamente al ovario formando una funda tubular con dos estigmas. La funda está cubierta con pelos pequeños que tienen tallos circulares muy cortos cuyas glándulas secretan gotas de resina abundante a altas temperaturas. La función de dichas glándulas es la de proteger a la planta de los animales. La parte femenina de la flor (gineceo) consiste de un ovario globoso coronado por dos estigmas largos y delgados que capturan el polen. El ovario tiene un óvulo del que, después de la fecundación, los estigmas se desprenden rápidamente presentando un incremento en su tamaño. La fruta se llama aquemo la cual contiene una semilla sencilla cubierta con una cáscara ligeramente dura revestida por una pared fina del ovario. Los aquemos se consideran en la práctica como una "semilla" la cual tiene forma elipsoide, ligeramente comprimida, suave y resbalosa de 2.5-5.0 mm de largo y de 2.0-3.5 mm de diámetro; su color va del gris al café. El embrión que contiene la semilla es muy curvado con dos cotiledones empacados a lo largo, de un lado, y del otro la raíz junto con un pequeño suplemento alimenticio (endosperma); estos componentes son ricos en aceite (6, 21, 25, 36).

A continuación se indican las principales diferencias entre las tres especies de *Cannabis*.

***Cannabis sativa***. Plantas generalmente largas con entramado flojo, aquemos planos generalmente faltos del jaspeado en la cubierta externa, adheridos con firmeza al tallo y sin articulación definida (25).

***Cannabis indica***. Plantas generalmente pequeñas con entramado denso, aquemos comúnmente jaspeados en la capa externa. Las plantas tienen una gran cantidad de ramas, más o menos cónicas, generalmente de 4 pies de altura o menos y cuentan con una articulación en la base del aquemo (25).

***Cannabis ruderalis***. Plantas no entramadas o con ramas generalmente muy espaciadas, de 1 a 2 pies de altura (25).





1) Parte superior de la planta macho, con flores. 2) parte superior de la planta hembra con frutos; 3) germinación de la planta; 4) foliolo de una hoja dividida en once partes. 5) porción de una inflorescencia estaminifera, con capullos y flor madura. 6) flores hembras. 7) fruto encerrado en una bráctea resistente; 8) fruto, vista lateral; 9) fruto, vista posterior. 10) vellosidad glandular con tallo multicelular; 11) vellosidad glandular con tallo corto, visible, de una sola célula; 12) vellosidad no glandular conteniendo un estolito.

#### 4. CONSTITUYENTES QUIMICOS DE LA MARIHUANA

Las plantas hasta antes de florecer sólo tienen dos tipos de pelos:

1.- Los tricomas (pelos unicelulares) son largos y delgados y terminan en punta. Son pocos hasta que la planta madura, entonces los tricomas aumentan en número localizándose especialmente en las ramas que sostienen las flores donde forman una pelusa sedosa (21, 25).

2.- Los pelos cistolíticos que son cortos y anchos en la base con células epidérmicas colocadas en forma circular. Terminan en forma obtusa y contienen cristales de oxalato de calcio. Se encuentran casi en la superficie de las hojas y en las brácteas y ocasionalmente en la superficie inferior de las ramas (21, 25).

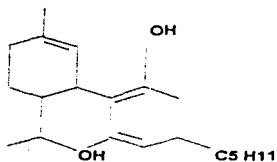
Cuando la planta se acerca a la madurez, comienza a cubrirse de pelos glandulares multicelulares constituidos por una base de dos células cúbicas sostenidas de células epiteliales y una cabeza globular de 4 células estando cubiertas por una cutícula. En la planta madura, la cabeza llega a tener hasta 16 células acomodadas radialmente las cuales secretan un aceite rico en cannabinoides (nombre genérico que se da a las sustancias bioactivas derivados de *MARIHUANA*) el cual se acumula entre las células y la cutícula. Cuando se acumula suficiente aceite la cutícula se rompe liberando el aceite que se seca produciendo una resina (compuesta aproximadamente por el 50 % de cannabinoides); la resina es un semisólido pardo, amorfo y soluble en alcohol, éter y disulfuro de carbono (36).

Los cannabinoides están constituidos por una parte aromática ( $C_{11}$  o  $C_{12}$ ), derivado teóricamente de seis unidades acetato y un componente isoprenoide ( $C_{10}$ ). Al parecer constituyen un grupo natural de terpenofenoles ( $C_{21}$ ) de representación única. Muchos cannabinoides son insolubles en agua y en la planta probablemente se presentan en forma de ácidos carboxílicos (4, 36). Cuando se aíslan de una planta fresca generalmente se encuentran en forma de ácido, los cuales no son activos biológicamente, hasta que se descarboxilan por acción del calor. Algunos de los principales cannabinoides son cannabinol, tetrahidrocannabinol, cannabigerol, cannabidiol, ácido cannabidiol-carboxílico y cannabicromeno, entre los más de 61 compuestos de esta familia (4, 6, 21, 25, 36).

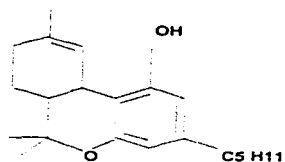
**La función de los cannabinoides en la planta es desconocida, sin embargo, se cree que al ser constituyentes importantes de la resina sirven para proteger a la planta de agentes patógenos o herbívoros (21).**

**Además de los cannabinoides, la planta posee una pequeña cantidad de aceite esencial levógiro que contiene terpenos y un sesquiterpeno (cannibeno), también las bases colina, trigonelina, espermidina y un alcaloide (Cannabisativina), O-heterósidos flavoníodes de la vitexina, orientina y carbonato de calcio, entre otros (4, 21).**

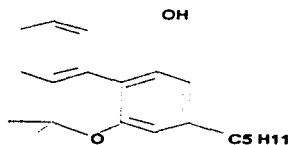
## PRINCIPALES COMPONENTES QUIMICOS DE LA Cannabis Sativa L



**Cannabidiol**



**Tetrahydrocannabinol**



**Cannabinol**

## 5. FARMACOLOGÍA DE LA MARIHUANA

El delta-9-tetrahidrocannabinol ( $\Delta$ -9-THC) es el principal agente activo de los compuestos cannabinoides y de las más de 300 sustancias activas presentes en la planta de *MARIHUANA*. Los efectos del  $\Delta$ -9-THC a nivel celular no se conocen con certeza aunque se sabe que pequeñas dosis producen cambios en el Sistema Nervioso Central (SNC) propios de los cannabinoides. Dosis más elevadas producen efectos del tipo de drogas sedantes-hipnóticos; el mecanismo parece ser la perturbación o la fluidización de membranas similares a las producidas por los anestésicos lipofílicos. Algunos de los efectos cannabinoides al parecer son estereoespecíficos, debido a que pequeñas modificaciones de la molécula dan lugar a profundos cambios en los efectos, esto implica la probable existencia de receptores específicos que aún no se identifican o más probablemente una reacción estereoespecífica con los lípidos o proteínas de la membrana (14, 17).

El  $\Delta$ -9-THC interactúa con los sistemas neurotransmisores noradrenérgicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos, "GABAérgicos" y con varios neuropéptidos. Tiene efectos del tipo barbitúrico, actividad anticonvulsivante, depresión de los reflejos polisinápticos, analgésicos, aumento de la síntesis de catecolaminas, hipotermia y actividad antidiarréica. Se ha observado que el consumo de *MARIHUANA* induce un aumento en la actividad del sistema límbico por lo que se cree estimula directamente el mecanismo del placer y satisfacción en el cerebro. También desarrolla rápidamente una tolerancia tanto para los efectos autonómicos como para los psicoactivos presentándose un síndrome de abstinencia caracterizado por irritabilidad, anorexia, temblores y signos colinérgicos (17, 24).

Los cannabinoides tienen un elevado índice terapéutico por lo que se desconocen las dosis letales en el hombre. Los efectos predominantes por el consumo de *MARIHUANA* se dan en el SNC; consisten en una estimulación cerebral con alteración del humor y del razonamiento, de la percepción sensorial y temporal con despersonalización. El deterioro de la memoria a corto plazo y de los recuerdos disminuyen la capacidad de comportamiento dependiente de la memoria orientado en el tiempo y dirigido a un objetivo, efecto que se conoce con el nombre de "desintegración temporal". A dosis bajas los efectos motores consisten en una disminución de la fuerza, del equilibrio y de la estabilidad mientras que en dosis mayores la coordinación y la capacidad de seguir un camino se ven alteradas (17,28).

Algunos consumidores con dosis bajas pueden estar deprimidos en lugar de eufóricos, con ansiedad y confusión en el pensamiento. Con dosis elevadas se tiene conocimiento de casos de pánico intenso, paranoia, ilusiones, alucinaciones y psicosis tóxica. Además de que las enfermedades psiquiátricas preexistentes se pueden exacerbar. Otros estudios demuestran que no hay deterioro de la función intelectual sino por el contrario, se han obtenido calificaciones de CI "superiores" y "muy superiores" en individuos que han consumido *MARIHUANA* en promedio 7 años. Otros efectos son la congestión de los vasos de la conjuntiva y una ligera contracción pupilar. La conjuntiva enrojecida es un indicador de los niveles de  $\Delta$ -9-THC y del efecto de *MARIHUANA* (17).

Los efectos cardiovasculares son la taquicardia y el aumento del flujo cardíaco con poco o ningún aumento en la presión arterial. Con dosis altas se puede observar una vasoconstricción cutánea al parecer mediada por receptores alfa que progresa a una vasodilatación periférica con el deterioro de los efectos vasculares simpáticos causando una hipotensión ortostática (16, 17).

Los efectos pulmonares por consumo de *MARIHUANA* incluyen tos y altas irritaciones en las vías respiratorias, así como una broncodilatación de larga duración. La *MARIHUANA* al ser fumada contiene aproximadamente 10 veces más irritantes respiratorios y más cancerígenos que el tabaco normal. El humo contiene sustancias cancerígenas como las naftilaminas, nitrosaminas, benceno, benzantrazeno y benzopireno en cantidades superiores al doble de las del tabaco (4, 17, 25).

Los efectos gastrointestinales se limitan a sequedad de la boca y náuseas ocasionales, pero en pacientes sometidos a algún tratamiento quimioterapéutico se ha observado un efecto antiemético. También se presenta retención urinaria lo que probablemente se debe al aumento del tono simpático (17).

Los cambios endocrinológicos consisten en ginemastia y alteraciones de la función reproductiva, que incluye la disminución del volumen testicular, de las concentraciones de prolactina y de la espermatogénesis testicular con aumento de las formas anormales. El consumo materno de *MARIHUANA* se asocia con bajo peso al nacer, nacimientos prematuros, baja calificación Apgar y un aumento no significativo de malformaciones fetales (4, 17, 25).

## 6. METABOLISMO DE LA MARIHUANA

El consumo de la marihuana es principalmente por inhalación (fumada) puesto que es un modo sencillo y rápido de suministrarlo al organismo. El porcentaje de absorción por esta vía es del 10-50 %. Sin embargo, se dice que entre los consumidores frecuentes las concentraciones plasmáticas alcanzadas son mucho más elevadas que entre los consumidores ocasionales (17). El  $\Delta$ -9-THC, que es el principio bioactivo más importante de los cannabinoides en el organismo, se encuentra ampliamente distribuido en toda la planta variando en su contenido desde las trazas hasta el 4 % (en peso) (21, 25).

Cuando se inhala marihuana, el  $\Delta$ -9-THC entra a los pulmones donde se absorbe rápidamente. Los metabolitos producidos en el pulmón son hidroxilados en la cadena lateral mientras que cuando se consume  $\Delta$ -9-THC en forma oral los metabolitos generados son derivados hidroxilados del ciclohexeno (26). Una vez que el  $\Delta$ -9-THC llega al plasma se enlaza casi totalmente a las proteínas para posteriormente distribuirse al hígado y tejidos periféricos con alto contenido lipídico donde se almacena para liberarse con lentitud (14, 17).

El  $\Delta$ -9-THC se detecta en el plasma inmediatamente después de la primer inhalación, no obstante, las concentraciones máximas de  $\Delta$ -9-THC plasmático oscilan entre los 84 y los 162 ng/ml en un tiempo de 4 a 10 min posteriores a fumar un cigarro de marihuana. Después de dos horas, el  $\Delta$ -9-THC disminuye rápidamente a concentraciones de 5 ng/ml o menos, permaneciendo detectable hasta las 12.5 horas. El tiempo de vida media final de  $\Delta$ -9-THC plasmático es de 4.1 días, el volumen de distribución (beta) de 97 litros, el volumen de distribución (en estado estable) de 75 litros (24) y la depuración plasmática de 777 ml/min (24).

En el hígado, el  $\Delta$ -9-THC se transforma en ácido 11-nor-D-9-Tetrahidrocannabinol carboxílico (THC-COOH) a través de la formación intermedia del 11-hidroxi-Tetrahidrocannabinol (11-OH-THC) mediante la intervención del citocromo P-450 y una subsecuente oxidación al correspondiente ácido carboxílico. La oxidación del 11-OH-THC al THC-COOH se puede atribuir a la enzima aldehído deshidrogenasa o recientemente a una isoenzima del citocromo P-450. De esta forma, los principales metabolitos del  $\Delta$ -9-THC son: 11-OH-THC y el THC-COOH (libre y su éster-glucurónico) (9).

Se cree que el 11-OH-THC es el metabolito activo responsable de muchos de los efectos producidos por el  $\Delta$ -9-THC, sin embargo, en la actualidad existe controversia debido a la falta de efectos inmediatos después de la administración intravenosa del 11-OH-THC. Aún cuando el metabolito se puede detectar en plasma después de la segunda inhalación, el 11-OH-THC plasmático alcanza su concentración máxima de 6.7 a 7.5 ng/ml en un tiempo de 12 a 15 min. Se ha calculado que los niveles de 11-OH-THC plasmático representan del 6 al 10 % de la concentración de  $\Delta$ -9-THC plasmático presente hasta 45 min después de comenzar a fumar. El tiempo de detección es hasta de 11.2 horas, siendo probable que el 11-OH-THC desaparezca antes que el  $\Delta$ -9-THC plasmático (24).

Las concentraciones de THC-COOH plasmático se incrementan lenta y paulatinamente en un periodo de tiempo prolongado. Este metabolito inactivo se puede detectar en plasma hasta 8 min. después de comenzar a fumar la droga. los niveles pico alcanzados son considerablemente menores que los niveles máximos de  $\Delta$ -9-THC detectados pero mayores que la concentración pico de 11-OH-THC. Los niveles máximos de THC-COOH se ubican entre los 24 y los 54 ng/ml en un tiempo promedio de 1.9 horas. La vida media del THC-COOH es de aproximadamente 4-6 días y el tiempo en que se detecta varía de los 3.5 a 7 días (24, 27).

En el hígado el THC-COOH plasmático, es conjugado con el ácido glucurónico para posteriormente eliminarse del organismo a través de heces y orina (9, 12). Las concentraciones plasmáticas de THC-COOH conjugado se pueden cuantificar hasta los 12 días después de la ingestión. La vida media del THC-COOH conjugado plasmático es, al igual que el de la fracción libre del metabolito, de 4 a 6 días. En la orina, el THC-COOH conjugado es el principal metabolito presente y tiene concentraciones menores a los 25 ng/ml a los 12 días así como pequeñas cantidades de THC-COOH libre (24, 27).

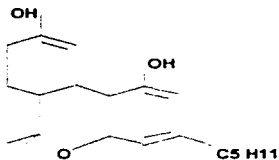
No obstante que las concentraciones máximas de  $\Delta$ -9-THC plasmático se alcanzan en unos cuantos minutos los efectos clínicos máximos (tanto cardiovasculares como en el sistema nervioso central) tardan de 20 a 30 min para presentarse, presumiblemente porque la droga se distribuye desde el plasma hasta el cerebro y otros tejidos. Aproximadamente el 65 % de los metabolitos se excretan por heces, del 18 al 23 % en la orina eliminando en 5 días del 80 al 90 % de la droga consumida. El porcentaje restante (10 ó 20 %) se excreta mediante un mecanismo de lenta eliminación apoyado en la alta solubilidad de lípidos, junto con una recirculación enterohepática, una elevada distribución en tejidos grasos y la reabsorción renal (17).



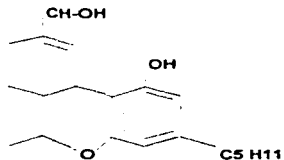
## FARMACOCINETICA DE LA MARIHUANA

<b>Absorción</b>	
Inhalación (fumada)	10-50 %
Oral	1-10 %
<b>Niveles pico</b>	
Inhalación (fumada)	4-10 min
Oral	45 min
<b>Concentración pico de <math>\Delta</math>-9-THC (fumado)</b>	84-162 ng/ml
<b>Tiempo de detección en plasma de <math>\Delta</math>-9-THC</b>	12.5 hrs
<b>Tiempo de vida máxima final de <math>\Delta</math>-9-THC</b>	hasta 4.1 días
<b>Depuración plasmática de <math>\Delta</math>-9-THC</b>	777 ml/min
<b>Volumen de distribución (beta) de <math>\Delta</math>-9-THC</b>	97 litros
<b>Volumen de distribución ( en estado estable) de <math>\Delta</math>-9-THC</b>	75 litros
<b>Unión a proteínas de <math>\Delta</math>-9-THC</b>	mayor a 99 %
<b>Metabolismo de <math>\Delta</math>-9-THC</b>	En el hígado el $\Delta$ -9-THC se metaboliza por el citocromo P-450 produciendo varios alcoholes (algunos activos 11-OH-THC) que después son metabolizados por la enzima aldehído hidrogenasa una isoenzima del citocromo P-450 a productos finales inactivos
<b>Producción de metabolitos</b>	
Pulmón	Derivados hidroxilados en la cadena lateral
Hígado	Derivados hidroxilados del ciclohexeno
<b>Nivel pico del 11-OH-THC en plasma</b>	12-15 min.
<b>Concentración máxima del 11-OH-THC en plasma</b>	6.7-7.5 ng/ml
<b>Nivel pico del THC-COOH en plasma</b>	1.9 hrs
<b>Concentración máxima del THC-COOH en plasma</b>	24-54 ng/ml
<b>Tiempo de detección del THC-COOH en plasma</b>	3.5-7.0 días
<b>Vida media del THC-COOH conjugado en plasma</b>	4-6 días
<b>Tiempo de detección del <math>\Delta</math>-9-THC conjugado en plasma</b>	hasta 12 días
<b>Eliminación</b>	
Orina	13-16 % después de 3 días
Heces	30-50 % después de 3 días
<b>Vida media del THC-COOH conjugado en orina</b>	hasta 2.0 días
<b>Concentración de metabolitos en orina</b>	menos de 25 ng a los 12 días

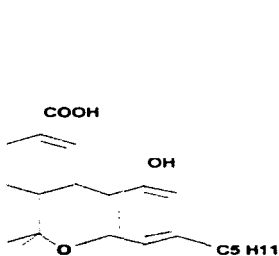
## ESTRUCTURAS QUIMICAS DE LOS METABOLITOS DE LA MARIHUANA



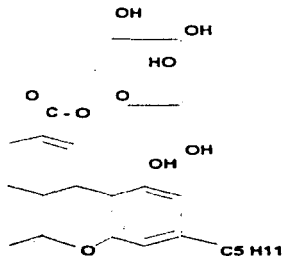
**delta-9-THC**



**11-OH-THC**



**THC-COOH libre**



**THC-COOH conjugado**

## 7. IDENTIFICACION DE LOS METABOLITOS EN EL LABORATORIO

La detección de muchos de los constituyentes farmacológicamente activos de la marihuana en los fluidos corporales después del consumo de **MARIHUANA** representa un gran reto para muchos de los laboratorios toxicológicos. En la marihuana, el  $\Delta$ -9-THC es considerado el principal agente activo. Así, la presencia de  $\Delta$ -9-THC o sus metabolitos (11-OH-THC, THC-COOH libre o conjugado) en los fluidos biológicos sirve para indicar si un individuo ha consumido marihuana (17, 34). En el reto de identificar a los consumidores de esta droga, se han desarrollado muchas técnicas analíticas. Dichos procedimientos tienen grados de especificidad variable y niveles de sensibilidad diferente, requieren de una determinada experiencia técnica y algunos necesitan equipos sofisticados, por lo que el costo de la prueba es variable. Debido a estas consideraciones, cada laboratorio realiza aquellos procedimientos más compatibles con sus recursos. Sin embargo, estas variaciones analíticas pueden dar resultados discordantes, lo que ocasiona gran controversia; por lo tanto en situaciones químico-legales, se utilizará en alguna acción punitiva el resultado analítico y este deberá estar apoyado por dos procedimientos técnicamente independientes de sensibilidad y especificidad comparable (17).

Existen muchas limitaciones para hacer las determinaciones de los metabolitos de **MARIHUANA** en los fluidos corporales (sangre, plasma y orina) (29). De acuerdo a las características farmacocinéticas del  $\Delta$ -9-THC y 11-OH-THC, la detección es muy difícil, ya que las concentraciones pueden ser extremadamente bajas, requiriéndose técnicas más sofisticadas que están fuera del alcance de muchos laboratorios (4). Además, en las situaciones químico-legales no siempre es posible obtener sangre sin la autorización del inculpado ya que puede alegar violación a las garantías individuales. Debido a lo anterior, la orina es la muestra analizada con mayor frecuencia para establecer el consumo de marihuana. En la orina, niveles de trazas (nanogramos) del principal metabolito libre o conjugado, pueden detectarse solo por métodos de análisis que poseen una alta especificidad y bajos niveles de detección (29).

Generalmente, diferentes métodos se utilizan para la detección de THC-COOH en las muestras urinarias. Estos métodos se basan esencialmente en dos principios: inmunoquímicos y cromatográficos.

### **INMUNOQUIMICOS**

Actualmente, en el comercio existe una gran cantidad de equipos que detectan la presencia del THC-COOH en la orina por el principio del inmunoensayo. El equipo que se utiliza depende en gran parte de la necesidad de obtener resultados rápidos y confiables, así podemos decir que existen equipos para pruebas de campo (pruebas que se realizan en el lugar donde son recolectadas las muestras de orina) y equipos para laboratorio. Los equipos para pruebas de campo se utilizan con frecuencia en los centros para el tratamiento de drogas, centros de trabajo, servicios de urgencias a nivel hospitalario y de consultorio médicos debido a la rapidez con que pueden obtenerse estos resultados (17, 34).

De los equipos para laboratorio, los más utilizados como pruebas de tamiz son los inmunoensayos enzimáticos (EMIT-EIA) (3, 7, 8, 13, 15, 17, 22, 31, 34), inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA-ADx) (1), y el radioinmunoensayo (RIA-COAT-A-COUNT) (9, 26, 34). El metabolito que se detecta en estas determinaciones es el THC-COOH, aunque otros metabolitos y cannabinoides pueden reaccionar en forma cruzada durante el ensayo. La sensibilidad de los procedimientos de las pruebas de detección selectiva pueden cambiarse intencionalmente por calibración y habitualmente se ajusta de modo que se limite el número de falsos resultados positivos o de aquellos que se consideran debidos a la inhalación pasiva de marihuana (34). Los dos análisis más usados son los sistemas EMIT-dau y EMIT-st, con líneas de corte para señalar resultados positivos a los 20 y 100 nanogramos por mililitro, respectivamente. El método se basa en la competición entre la droga en la muestra y la droga marcada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) para los lugares 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-adeninucleótido (NAD) a NADH, lo que causa un cambio en la absorbancia que puede medirse espectrofotométricamente. (15, 17)

La principal ventaja de estas pruebas inmunoquímicas de escrutinio es la facilidad con que las muestras pueden ser ensayadas y la alta sensibilidad que poseen permitiendo la detección del metabolito en unidades de nanogramos, además de dar la facilidad de trabajar grandes lotes de muestras. La principal desventaja de estas pruebas es que los anticuerpos utilizados no son específicos para el THC-COOH y poseen una alta susceptibilidad a reaccionar en forma cruzada con compuestos urinarios endógenos o no relacionados con los cannabinoides, lo cual produce resultados falsos-positivos.

Por la razón anterior, se recomienda que los resultados positivos por alguna técnica inmunoenzimática para la determinación de los metabolitos de  $\Delta$ -9-THC, sean confirmados por otro método químico (1,3, 5, 15, 17, 22, 23, 26, 30).

La adulteración de las muestras de orina con líquidos ácidos, alcalinos o con sal de mesa resultan en una alteración de la reacción enzimática de la prueba pudiendo producir resultados falsos-negativos. Por otra parte, el agregado de jabón líquido (el cual se encuentra en los lavabos en donde se obtiene la muestra sin vigilancia), sangre u otras sustancias pueden producir una opacidad causando un cambio en la absorbancia de la luz pudiendo llevar también a un resultado falso-negativo, como puede hacerlo también la precipitación de fosfatos y oxalatos normales en las muestras refrigeradas. La dilución de las muestras de orina mediante la ingestión de grandes cantidades de líquidos, el consumo de diuréticos y el agregado de agua de la llave pueden disminuir la concentración de los cannabinoides por debajo del nivel de detección de la prueba. Por lo tanto, es importante recolectar la muestra bajo supervisión directa o comprobar la temperatura de la orina, la densidad específica, el pH, el color, la concentración urinaria de creatinina, la sedimentación, .etc (17).

#### CROMATOGRAFICOS

Los métodos cromatográficos (TLC, GC, HPLC y GC-MS) son los métodos de elección para la identificación confirmatoria de las muestras de orina positiva por algún método inmunológico. Todos ellos poseen elevada sensibilidad y límites de detección muy bajos, así como una excelente especificidad por lo que en los laboratorios toxicológicos se utilizan frecuentemente. El método cromatográfico recomendado con mayor frecuencia para la confirmación rutinaria de una prueba inmunológica positiva para cannabinoides es el sistema de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). La GC-MS es por su alta sensibilidad y selectividad la metodología de elección para la confirmación de la detección del THC-COOH en orina y otros fluidos corporales (2, 4, 11, 15, 37, 38).

Desafortunadamente, debido al alto costo del equipo y a la necesidad de contar con personal altamente especializado en el manejo de éste, muchos laboratorios no tienen acceso al sistema de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas para la confirmación rutinaria de las muestras positivas en los ensayos inmunológicos (4, 11).

Así mismo, se han desarrollado técnicas utilizando la cromatografía de gases (GC) (19, 23) y la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) (26), como métodos de confirmación de muestras positivas para cannabinoides en orina con buenos resultados. No obstante, a continuación mencionamos algunas de las limitaciones más importantes de estos métodos.

Para GC debemos considerar la necesidad de contar con una derivatización previa a la introducción de la muestra al equipo, con la finalidad de mejorar las características cromatográficas y evitar la descarboxilación de la molécula; la posibilidad de que la molécula se adsorba en las paredes de la columna o la fase estacionaria y la necesidad de contar con un detector de captura de electrones (ECD) (23), que es mucho más sensible que el de ionización de flama (FID) (19); contar con un personal especializado y altamente capacitado para el manejo y la interpretación de los resultados (5, 11, 20).

Cuando se utiliza HPLC como técnica de confirmación de cannabinoides existen varias ventajas: es innecesaria la derivatización y la muestra puede ser introducida al equipo sin tratamiento alguno previo, lo que reduce el tiempo del análisis; el uso de columnas fase reversa permite que la fase móvil sea acuosa, que es un medio más apropiado para el análisis de los metabolitos de  $\Delta$ -9-THC; no es necesario liberar a la droga y sus metabolitos de sus conjugados antes del análisis, además de hacer uso de un sistema de partición antes que el sistema de adsorción, por lo que la calidad de los cromatogramas obtenidos carecen de tanto coteo. La principal desventaja es que muchos laboratorios toxicológicos no cuentan con el apoyo logístico para efectuar estos análisis (26).

Dentro de este marco, se utiliza con frecuencia a la cromatografía de capa fina (TLC) como una técnica tamiz o confirmatoria en el análisis de metabolitos de drogas de abuso (7, 10, 13, 15, 22, 30). Se aplica por igual a drogas en estado puro, a las extraídas de formulaciones farmacéuticas, a materiales manufacturados ilícitamente y a muestras biológicas. Se conoce como un método analítico primario debido a su sencillez, seguridad, bajo costo y selectividad de detección, aún cuando se recurra a diferentes procedimientos de localización (20).

Es un método de cromatografía en que una fase móvil se mueve por capilaridad a través de una delgada capa de fase estacionaria (adsorbente) enlazada a una placa (20).

Cuando una mezcla de drogas se aplica a una cromatoplaaca y se desarrolla con la fase móvil adecuada, las drogas se mueven a través de la placa, a diferentes velocidades dependiendo de sus solubilidades, valores de  $Pk'a$ , polaridad y capacidad de formar puentes de hidrógeno. Aunque la TLC es principalmente una técnica de separación, bajo condiciones controladas puede ser utilizada para identificar y cuantificar (20).

Algunas de las ventajas que tiene la TLC sobre la GC y HPLC son: el equipo es pequeño y se utiliza sin la necesidad de un calentamiento previo, varias muestras pueden ser analizadas simultáneamente, no requiere de un personal especializado y tiene una gran flexibilidad en la elección de la fase estacionaria y la fase móvil. También tiene la ventaja que una sustancia colocada sobre una cromatoplaaca permanece en ella, evitando los problemas de detección, asociados con la no-elución y enmascaramiento por el frente del solvente (20). Los límites de detección para el THC-COOH urinario son de los 25 ng/ml utilizando 10 ml de orina, 20 ng/ml usando 10 ml de orina y 50 ng/ml usando 20 ml de orina con cromatoplaacas convencionales. También se reportan límites de detección de 2 ng/ml utilizando 2 ml de orina; tal sensibilidad puede lograrse sólo con cromatoplaacas de Cromatografía de Capa Fina de alta resolución (HPTLC) (7, 10, 13, 18, 22, 30).

### **8. OBJETIVO**

**Establecer una técnica específica y sencilla para la identificación confirmatoria del principal metabolito de MARIHUANA, ácido 11-nor-deelta-9-tetrahidrocannabinol carboxílico, en orina por cromatografía de capa fina.**



## 9. DISEÑO EXPERIMENTAL

### MATERIAL

Las cromatoplasmas de 20x20 cm para cromatografía de capa fina están pre-cubiertas con sílica Gel F-254 se obtienen de Merck Co.  
Tubos de boro silicato de 100x16 mm con tapón.

### REACTIVOS

Metanol grado reactivo.  
Hexano grado reactivo.  
Acetato de etilo grado reactivo.  
Hidróxido de amonio (20-30 %).  
Cloroformo grado reactivo.  
Ácido clorhídrico concentrado.

### ESTANDARES Y SOLUCIONES

THC-COOH en una concentración de 200 ng/ml de orina.  
Buffer de fosfatos pH= 2.4  
Solución de NaOH 10 N  
Solución acuosa de azul rápido BB 0.1 % (p/v).

### MUESTRAS DE ORINA

Las 30 muestras de orina analizadas se obtienen de personas que:  
1).- Están en un programa de desintoxicación de drogas de abuso,  
2).- Que las donan voluntariamente para el estudio, y  
3).- Que se desconoce si consumen drogas.

### Preparación del material de vidrio.

El material de vidrio se somete a un tratamiento de limpieza previo al uso en el trabajo experimental. Una vez seleccionado, se lava perfectamente bien y se deja por una noche en una solución de hipoclorito de sodio al 5 %. Al día siguiente se lava con agua destilada y se deja por una noche en HCL al 5 % ; posteriormente se enjuaga con agua destilada y etanol puro. Por último se seca en la estufa.

## METODOS

### **Procedimiento Inmunoenzimático.**

El análisis presuntivo se realizó usando el sistema de reactivos EMIT-dau Syva en un equipo EMIT-ets con fotómetro integrado que utiliza como fuente de luz un bulbo de tungsteno-halógeno proporcionado por el fabricante. El ensayo EMIT-cannabinoides utiliza glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G-6-P-D) como una enzima marcadora. Los resultados son obtenidos en una alícuota de la muestra. Los resultados se consideran positivos si producen una AOD igual o mayor a la producida por su respectivo reactivo de calibración de corte (cuttoff) de 100 ng/ml. Después del análisis presuntivo las muestras se almacenan en un congelador a -20°C. Las muestras se almacenan en el mismo contenedor en que se proporcionan para su análisis inicial.

### **Ensayo confirmatorio por TLC.**

a).- Hidrólisis y extracción. 5 ml de orina se incuban por 30 min a 50-80°C con 1 ml de KOH 10 N y 2 ml de metanol. Después se enfría a temperatura ambiente y se ajusta el pH de la muestra con HCL concentrado y 1 ml de buffer de fosfatos pH= 2.4. La muestra de orina se extrae con 3 ml de hexano:acetato de etilo (7:1) agitándose en un vortex por 2 min. Posteriormente se separa la fase orgánica en un tubo limpio y se evapora a sequedad con corriente de aire. Ocasionalmente se forma una emulsión la cual se rompe fácilmente removiendo el tubo de extracción con una pipeta Pasteur y retirando la mayor cantidad de fase orgánica con la misma pipeta. Al resto de la emulsión se le agrega 50 uL de n-butanol y el tubo se centrifuga por espacio de 1 min. La emulsión se rompe produciendo una capa acuosa debajo de la mezcla hexano:acetato de etilo. Posteriormente, se lavan las paredes del tubo con 500 uL de cloroformo:metanol (3:1) y se evapora a sequedad con corriente de aire; por último se reconstituye en 20 uL de la misma mezcla.

b).- Desarrollo cromatográfico. Aplicar 10 uL del extracto de la muestra (testigo positivo, testigo negativo o muestra cuestionada) sobre la cromatoplaaca de 20 x 20 cm recubierta con sílica gel F-254, con un aplicador capilar calibrado. Cuando las aplicaciones se terminan, la placa se seca a 90°C por 5 min y se deja enfriar a temperatura ambiente. La fase móvil constituida por cloroformo:metanol:hidróxido de amonio en proporción 50:45:5 se adiciona a la cámara de Thomas. Se introduce la cromatoplaaca y se deja correr el solvente hasta las 3/4 partes de la misma. La placa se retira de la cámara de Thomas y se seca en una estufa a 90°C por 5 min.

Se prepara el agente revelador disolviendo el azul rápido BB (fast blue BB) en agua para hacer una solución al 0.1 %. La placa se coloca en una campana de extracción y se rocía con la solución reveladora en toda la superficie. Después se coloca en una estufa a 75°C para secar. El THC-COOH se presentará como una banda rosa-rojo con un Rf de 0.31-0.33. Todos los resultados se reportan como positivos o negativos.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez obtenidos los resultados del análisis inmunoensayo enzimático múltiple (EMIT), y aplicada la cromatografía de capa fina sobre las muestras sometidas a estudio, se procedió a realizar un ensayo estadístico (media, desviación estándar, coeficiente de variación y correlación de resultados) entre ambos procedimientos para las muestras.

Para el inmunoensayo enzimático múltiple (EMIT) se tomaron las lecturas correspondientes a las  $\Delta OD$  de las muestras en los intervalos que se especifican en el cuadro siguiente:

• $\Delta OD$	Número de muestras	Media ( $\Delta OD$ )	Desviación estándar ( $\Delta OD$ )	Coefficiente de variación %
• menos de 739	11	722	6.9	0.95
• 740-800	3	758.3	24.5	3.23
• 801-900	13	850.5	27.5	3.23
• 901-929	3	912	12.2	1.33

Como se puede observar, los parámetros estadísticos son aceptables ( $C_v < 5\%$ ) aun cuando la prueba inmunoenzimática esta diseñada para indicar si una muestra de orina contiene o no el metabolito de MARIHUANA por encima del limite de detección (línea de corte), en este caso de 100 ng/ml; es decir, es un ensayo cualitativo altamente sensible y específico que depende de la concentración del metabolito presente en la muestra.

Quando determinamos los mismos parámetros estadísticos para el método cromatográfico obtenemos los siguientes valores:

<b>Rf</b>	<b>Número de muestras</b>	<b>Media (Rf)</b>	<b>Desviación estándar (Rf)</b>	<b>Coefficiente de variación %</b>
<b>0.31-0.33</b>	<b>19</b>	<b>0.32</b>	<b>0.006</b>	<b>0.187</b>

De los datos anteriores se infiere que este procedimiento es reproducible bajo las condiciones de trabajo en que fue realizado no dependiendo de la concentración del metabolito presente en la muestra de orina.

**TABLA DE PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION  
PARA METABOLITOS DE MARIHUANA**

**5 ml DE ORINA + 1 ml DE KOH10 N + 2 ml DE METANOL**

INCUBAR A 50-60° C  
POR 30 min

▼  
**AJUSTAR EL pH A 3.0 CON BUFFER FOSFATOS pH= 3.0  
Y HCl CONCENTRADO**

▼  
**EXTRAER CON 3 ml DE HEXANO:  
ACETATO DE ETILO (7:1)**

AGITAR EN VORTEX  
POR 2 min

▼  
**EVAPORAR A SEQUEDAD EN CORRIENTE DE AIRE SECO**

▼  
**CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA  
DE ALTA RESOLUCION**

## 10. ANALISIS DE RESULTADOS

**El análisis de las 30 muestras de orina para detectar la presencia del THC-COOH por EMIT-dau arroja los siguientes resultados:**

Usando 100 ng de cannabinoides por ml de orina como un límite de detección (EMIT-ets), 19/30 muestras son positivas y 11/30 tienen resultados negativos. Los resultados positivos tienen una  $\Delta OD$  de 740 a 929 lo que significa que semicuantitativamente el 63.3 % de las muestras tienen una concentración mayor o igual a 100 ng de cannabinoides urinarios por ml. De ellos el 15.8 % tiene una  $\Delta OD$  mayor o igual a 740-800, el 68.4 % tiene entre 801-900 y sólo el 15.8 % tiene una  $\Delta OD$  mayor a 901. Por lo tanto, las muestras de orina positivas (68.4 %) tienen lecturas de  $\Delta OD$  mayores a los 100 ng de cannabinoides/ml de orina.

Cuando las muestras se someten a la cromatografía como método confirmatorio de cannabinoides urinarios, se tienen los siguientes resultados: 18/30 muestras son positivas y 12/30 muestras son negativas. Se observa que de las muestras de orina clasificadas como negativas, dos tienen una  $\Delta OD$  de 741 por el método inmunoenzimático (EMIT-dau) que las clasifica como positivas. Estas muestras están muy cerca de la línea de corte por lo que el procedimiento cromatográfico las clasifica mejor como negativas.

El THC-COOH se identifica claramente como una banda rosa en un  $R_f$  de 0.31-0.33, al aplicar el azul rápido al 0.1 % como agente revelador. No se presentan problemas para la interpretación del cromatograma ya que el color desarrollado revela claramente las muestras de orina positivas de las negativas. Las aplicaciones marcadas como 1 y 2 son los cromatogramas típicos de muestras de orina positivas y negativas. Los extractos de las muestras cuestionadas son limpios en términos generales, aunque ocasionalmente generan tinciones no características de substancias endógenas urinarias.

**Los resultados obtenidos de las muestras de orina analizadas por cromatografía de capa fina y valores de  $R_f$  se muestran en la tabla de la página siguiente.**

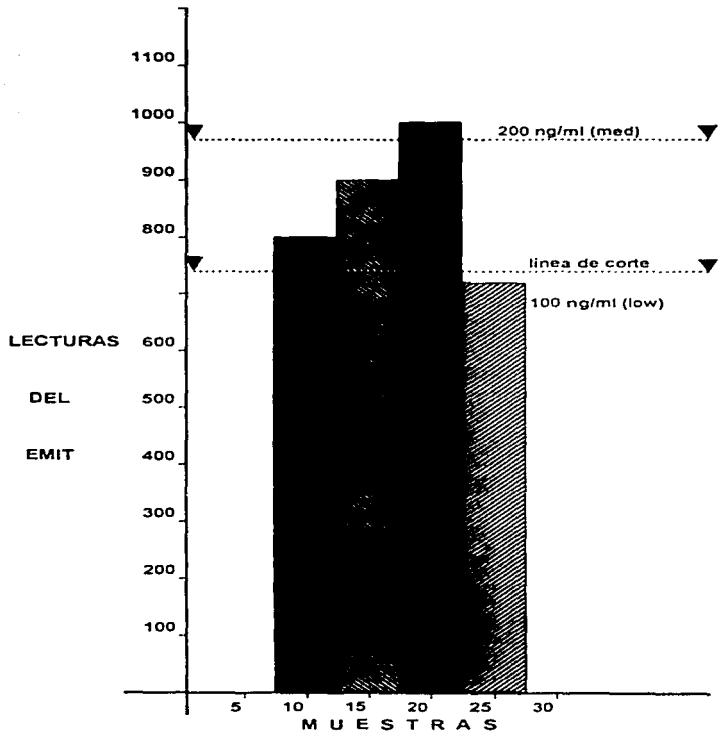
<b>ANALISIS POR</b>	<b>CROMATOGRAFIA</b>	<b>DE CAPA FINA</b>
<b>Muestra</b>	<b>Rf</b>	<b>Resultado</b>
Control positivo	0.32	positivo
Control negativo	0.00	negativo
1	0.00	negativo
2	0.00	negativo
3	0.32	positivo
4	0.00	negativo
5	0.32	positivo
6	0.00	negativo
7	0.32	positivo
8	0.00	negativo
9	0.00	negativo
10	0.32	positivo
11	0.31	positivo
12	0.32	positivo
13	0.00	negativo
14	0.32	positivo
15	0.33	positivo
16	0.00	negativo
17	0.32	positivo
18	0.33	positivo
19	0.33	positivo
20	0.33	positivo
21	0.32	positivo
22	0.00	negativo
23	0.00	negativo
24	0.00	negativo
25	0.33	positivo
26	0.33	positivo
27	0.33	positivo
28	0.32	positivo
29	0.33	positivo
30	0.00	negativo

ANALISIS POR		EMIT-DUA
Muestra	LECTURA ΔOD	
		Resultado
1	714	negativo
2	720	negativo
3	728	negativo
4	725	negativo
5	722	negativo
6	733	negativo
7	715	negativo
8	734	negativo
9	741	positivo
10	901	positivo
11	929	positivo
12	725	negativo
13	906	positivo
14	716	negativo
15	867	positivo
16	741	positivo
17	888	positivo
18	825	positivo
19	813	positivo
20	793	positivo
21	715	negativo
22	839	positivo
23	808	positivo
24	856	positivo
25	806	positivo
26	870	positivo
27	859	positivo
28	876	positivo
29	882	positivo
30	860	positivo

Calibrador	ΔOD	CONCENTRACION (ng/ml)
Nivel 0 (negativo)	643	0
Nivel 100 mg/ml (medio)	740	100
Nivel 200 mg/ml (alto)	971	200



### RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EMIT



## 11. DISCUSION

El principal agente psicoactivo de la marihuana es el  $\Delta$ -9-THC. Cuando se consume, se somete a un proceso metabólico que produce el 11-OH-THC como producto intermedio y el THC-COOH (libre o conjugado con ácido glucurónico) como producto final. Al 11-OH-THC se le confiere cierta actividad biológica, aunque esto aún es tema de discusión. El THC-COOH libre o conjugado se elimina principalmente por heces fecales y una pequeña parte se elimina por orina.

En los laboratorios toxicológicos, se han desarrollado una gran variedad de técnicas analíticas encaminadas a determinar la presencia del THC-COOH en su forma libre o conjugada en la orina. Estas técnicas se clasifican en inmunoquímico y cromatográfico, de acuerdo al principio que utilizan. En general los procedimientos inmunoquímicos se utilizan en primer instancia como métodos de escrutinio o tamiz, ya que son fáciles y rápidos de efectuar además de que tienen la característica de ser sensibles. Sin embargo, dado que existe la posibilidad de reacciones cruzadas de los anticuerpos utilizados con compuestos endógenos urinarios, dichos resultados deben de confirmarse por métodos alternos, como los cromatográficos.

Dentro de las técnicas cromatográficas disponibles (TLC, GC, HPLC, GC-MS), la utilizada por parte del laboratorio toxicológico dependerá de la logística con que cuente, de la infraestructura y personal capacitado y, sobre todo, del costo de cada análisis confirmatorio.

Dentro de este marco, se propuso efectuar el estudio del procedimiento inmunoenzimático múltiple (EMIT-dau) y la cromatografía de capa fina como técnicas complementarias para determinar la presencia del ácido carboxílico 11-nor- $\Delta$ 9-THC en diferentes muestras de orina. El estudio nos muestra que al utilizar el EMIT-dau con una línea (cutoff) de 100 ng de cannabinoides por ml de orina, sólo 2/30 muestras tienen resultados positivos y que al ser sometidas dichas muestras al procedimiento de TLC, producen resultados negativos. Estas muestras tienen una AOD muy próxima a la línea de corte (740). Los dos métodos son fáciles de realizar y requieren un mínimo de tiempo para efectuarse; no necesitan un equipo sofisticado y están al alcance de muchos laboratorios. Los costos se reducen significativamente al utilizar en forma complementaria estos dos procedimientos, evitando la necesidad de contar con pruebas tan costosas como la GC-MS.

Por otra parte, cuando se utiliza una concentración de cannabinoides de 100 ng/ml de orina como límite de detección (línea de corte) (cutoff), la probabilidad de confirmar un resultado positivo por estas técnicas es muy alta (aproximadamente del 100 %). Podemos decir que al utilizar el ensayo de EMIT-dau seguido por el ensayo cromatográfico propuesto en este trabajo, los resultados obtenidos son verdaderos y confiables para determinar la presencia del ácido carboxílico 11-nor-delta-9-THC en orina. Además, el ensayo tiene la característica de ser barato y accesible a la mayoría de los laboratorios toxicológicos.

Un aspecto importante al realizar este tipo de análisis toxicológicos es prevenir las pérdidas por adsorción del metabolito THC-COOH a las paredes del material de cristal utilizado. Los laboratorios toxicológicos, generalmente utilizan material de cristal silanizado o siliconizado debido a que se trabaja en unidades de nanogramos. En el presente estudio, no se tuvieron pérdidas detectables del metabolito THC-COOH al utilizar material de cristal no silanizado o no siliconizado debido al pretratamiento al cual fue sometido dicho material y a que se utilizó una combinación de solventes de cloroformo y metanol (en proporción de 3:1) como solvente resuspendedor del residuo de la extracción en el tubo de evaporación. Así, la pérdida del metabolito por adsorción a las paredes del cristal depende de la capacidad del solvente resuspendedor para recobrar los cannabinoides de las paredes del tubo de evaporación que contiene el residuo del proceso de extracción (18). Asimismo, el pretratamiento al cual fue sometido el material de vidrio con la finalidad de evitar pérdidas de cantidades significativas del metabolito cuestionado, demostró ser adecuado a las necesidades del estudio ya que nos permitió efectuar el análisis en tubos no silinizados o siliconizados evitando gastos en estos reactivos costosos. El lavado con etanol es efectivo para bloquear parcialmente el efecto de pérdida por adsorción en las paredes del cristal, y se complementa óptimamente con la mezcla de cloroformo:metanol como solvente resuspendedor del residuo en el tubo de evaporación.

En el presente trabajo, el sistema de solventes utilizado como fase móvil (cloroformo:metanol:hidróxido de amonio) y el sistema revelador empleado (azul rápido BB al 0.1%), muestran claramente la presencia del metabolito de *MARIHUANA* que produce valores de Rf que son estables en un rango (0.31-0.33) y en la coloración desarrollada, por lo que es fácil diferenciar una prueba positiva o negativa para una muestra de orina.

## 12. CONCLUSIONES

1. En la actualidad en humanos se conoce poco de la farmacocinética del principal metabolito de la marihuana, el  $\Delta$ -9-tetrahidrocannabinol, por lo que se requiere efectuar más estudios controlados en sujetos consumidores y en los no consumidores para establecer diferencias entre ambos.
2. A nivel de laboratorio, el método inmunoenzimático de escrutinio utilizado con mayor frecuencia por su rapidez y facilidad de manejo es el EMIT-dau seguido del método cromatográfico de elección para la confirmación GC-MS, debido a su alta sensibilidad y especificidad.
3. Los métodos inmunoenzimático (EMIT-dau) y cromatográfico (TLC) se complementan eficazmente para definir claramente las muestras de orina positivas de las negativas con presencia de metabolitos de *MARIHUANA*.
4. El método cromatográfico aplicado en este trabajo demostró ser específico y rápido para determinar la presencia del ácido 11-nor-delta-9-tetrahidrocannabinol carboxílico, en muestras de orina provenientes de personas las cuales se sospecha consumieron marihuana.
5. El tratamiento previo al cual se sometió el material de vidrio utilizado en el procedimiento cromatográfico y la mezcla de solventes cloroformo:metanol (en proporción 3:1) aplicada a las paredes del tubo de evaporación donde se encuentra el residuo de extracción, resultaron efectivos en impedir que el metabolito de *MARIHUANA* se adhiriera a las paredes del cristal evitando con ello pérdidas.
6. Se establece un procedimiento de confirmación del principal metabolito producido por el consumo de *MARIHUANA*, que tiene la ventaja de tener un bajo costo comparado con el análisis por GC-MS y ser accesible a muchos laboratorios para la determinación cualitativa de dicha sustancia.

## 13. BIBLIOGRAFIA

1. **ABBOTT LABORATORIES, Tdx Abused Drugs Assay Cannabinoids. Tomo III. USA. 1987.**
2. **A.M. LISI, R. KAZLAUSKAS and G. J. TROUT. Gas Chromatography-Mass Spectrometric Quantitation of Urinary 11-NOR-D-9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid after Derivatization by Direct Extractive Alkylation. Journal of Chromatography; 265-270; Vol. 617; 1993.**
3. **AMANDA J. JENKINS, WILLIAM D. DARWIN, MARILYN A. HUESTIS, EDWARD J. CONE and JOHN M. MITCHELL. Validity Testing accuPINCH THC Test. Journal of Analytical Toxicology; 5-12; Vol. 19; January/February 1995.**
4. **BENJAMIN J. GUDZINOWICZ and MICHAEL J. GUDZINOWICZ. Analysis of Drugs and Metabolites by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Chapter 2: Natural, Pirolytic and Metabolic Products of Marijuana. 271-479. Marcel Dekker Inc., New York and Basel. Vol. 6, 1980.**
5. **BERNARD TESTA. Advances in drug Research. Vol 19. 73-86; Academic Press Inc. San Diego, USA. 1990.**
6. **BUNETON D. Elementos de Fitoquímica y farmacognocia. Cuarta parte: Alcaloides. editorial Acriba. Zaragoza, España, 1991.**
7. **C A. SUTHIMER, R. YARBOROUGH, B. R. HEPLER and I. SUNSHINE. Detection and Confirmation of Urinary Cannabinoids. Journal of Analytical Toxicology; 156-160; Vol. 9; July/August 1985.**
8. **DAVID A. ARMBRUSTER, ROBERT H. SCHWARZHOFF, BARBARA L. PIERCE and EDWARD C. HUBSTER. Method Comparison of EMIT 700 and EMIT II with RIA for Drug Screening. Journal Analytical Toxicology; 110-117; Vol. 18; March/April 1994.**
9. **DAVID E. MOODY, LINDA F. RITTENHOUSE and KIM M. MONTI. Analysis for Forensic Specimens for Cannabinoids. I. Comparison of RIA and GC/MS Analysis of Blood. Journal of Analytical Toxicology; 297-301; Vol. 16; September/October 1992.**

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

...39

10. DAVID L. KING, MICHAEL J. GABOR, PATRICIA A. MARTELL, and MICHAEL O'DONNELL. A Rapid Sample-Preparation Technique for Thin-Layer Chromatographic Analysis for 11-NOR-D-9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid in Human Urine.
11. DAVID. B. JACHK. Dugs Analysis by Gas Chromatography. Chapter 2: Derivatization, 19-47. and Chapter 6: Measurement of Drugs in Body Fluids. 110-156. acadomic Press Inc. Orlando, Florida, USA. 1984.
12. DAVID. E. MOODY, KIM M. MONTI and DENNIS J. CROUCH. Analysis of Forensic Specimens for Cannabinoids. II. Relationship Between Blood D-9-Tetrahydrocannabinol and Blood and Urine 11-NOR-D-9-Carboxylic Acid Concentrations. Journal of Analytical Toxicology; 276-282; Vol. 16. September/October 1992.
13. DONALD L. FREDERIK, JUDY GREEN and MICHAEL W. FOWLER. Comparison of Six Cannabonoid Metabolite Assays. Journal of Analytical Toxicology; 116-120; Vol. 9; May/June 1985.
14. EDWARD R. GORRET and C. ANTHONY HUNT. Physicochemical Properties, Solubility, and Propein Binding of D-9-Tetrahydrocannabinol. Journal of Pharmaceutical Sciences; 1056-1064; Vol. 63; No. 7; July 1974.
15. EMIT-dau Package Insert. Syva Company, Palo Alto, California, USA.
16. GOODMAN and GILMAN. Las Bases Framacológicas de la Terapeútica. Capitulo 23: Drogadicción y Abuso de Drogas. Editorial Médica Panamericana. Séptima Edición, México 1986.
17. HEALTH CARE GROUP. Clínicas de Medicina de Urgencia de Norteamérica. Medicina de Urgencias y Drogadicción. Capitulo: Marihuana. 605-620; Vol. III. Editorial McGraws-Hill, USA., 1991.
18. J. A. VINSON, and LOPATOFSKY A. Semi-Automated Extraction and Spotting System for Drug Analysis by TLC. I.- Procedure for Analysis of de Mayor Metabolite of D-9-Tetrahydrocannabinol in Urine. Journal of analytical Toxicology; 6-9; Vol. 9; January/February 1985.
19. JOHN D. WHITING and WILLIAM W. MANDERS. Confirmation of Tretrahydrocannabinol Metabolite in Urine by Gas Chromatography. Journal Analytical Toxicology; 49-52; Vol. 6; January/February 1982.

20. JOSEPH. CHAMBERLAIN. *Analysis of Drugs in Biological Fluids. Chapter 10: Pitfalls and practical Solutions.* C.R.C. Press, INC. Boca Raton, Florida, USA. 189-204; Cuarta reimpression 1987.
21. JOYCE and CURRY. *Botany and Chemistry of MARIHUANA. Chapter 1: The MARIHUANA Plant: Botanical Characteristics.* 1- 10; Churchil and Livingston, Edinburgh, 1970.
22. K. K. KAISTHA and R. TADRUS. *Semi-Quantitative Thin Layer-Mass Sceening Detection of 11-nor-D-9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid in Human Urine.* *Journal of Chromatography*; 528-533; 237; 1982.
23. MAHAMOUD A. ELSOHLY, ELSAYED S. ARAFAT, and ALAN B. JONES. *Analysis of de Mayor Metabolite of D-9-Tetrahydrocannabinol in Urine. III.- A CG/ecd Procedure.* *Journal of Analytical of Toxicology*; 7-9; Vol. 8; January/February 1989.
24. MARILYN A. HUESTIS, JACK E. HENNINGFIEL and EDWARD J. CONE. *Blood Cannabinoids. I. Absortion of THC and Formation of 11-OH-THC and THC-COOH During and After Smoking Marijuana.* *Journal of Analytical Toxicology*; 276-282; Vol. 16; September/October 1992.
25. MICHAEL STARKS. *Marijuana Chemistry.* Ronin Publishing Inc. Berkeley, CA, USA. 1990.
26. P. L. WILLIAMS, A. C. MUFFAT and L. J. KING. *Combined High-Performance Liquid Cromatography and Radioimmunoassay Method for the Analysis of D-9-Tetrahydrocannabinol Metabolites in Human Urine.* *Journal of Chromatography*; 595-603; Vol. 186, 1979.
27. PEGGY KELLY and REESE T. JONES. *Metabolism of Tetrahydrocannabinol in Frequent and Infrequent Marijuana Users.* *Journal of Analytical Toxicology*; 228-235; Vol. 16; September/October 1992.
28. PETER T. FURST. *Alucinógenos y Cultura. Capitulo III: MARIHUANA (SPP.) y Derivados de la Nuez Moscada.* 72-77. Fondo de Cultura Económica, Primera Reimpression , México 1992.
29. R. C. McDOWALL. *Sample Preparation for Biomedical Analysis.* *Journal of Chromatography Biomedical Applications.* 3-58; Vol. 492; 1989.

30. R. C. MEATHERALL and J.C. GARRLOTT. A Sensitive Thin Layer Chromatography Procedure for the detection of Urinary 11-NOR-D-9-Tetrahydrocannabinol -9-Carboxylic Acid. *Journal of Analytical Toxicology*; 136-140; Vol. 12; May/June 1988.
31. RAY H. LIU, CINNAMON EDWARAS, L. DIANE BAUGH, J. L. WENG, MARY Jo. FYFE and AMRIK S. WALIA. Selection of an Appropriate Initial Test Cutoff Concentration for Workplace Drug Analysis-MARIHUANA Example. *Journal of Analytical Toxicology*; 65-70; Vol. 18; March/April 1994.
32. RICHARD EVANS SCHULTES. *Plantas Alucinógenas*. La Prensa Médica Mexicana, S. A. 1982.
33. RICHARD EVANS SCHULTES and ALBERT HOFMAN. *Plantas de los Dioses. Orígenes del Uso de los Alucinógenos. El Néctar de la delicia. MARIHUANA (Marihuana)*. pág. 92-101 Primera Reimpresión 1993. Fondo de Cultura Económica. México.
34. FERRARA, L. TEDESCHI, G. FRISON, G. BRUSINI, F. CASTAGNA, B. BERNARDELLI and D. SOREGAROLI. Drugs-of-Abuse Testing in Urine: Statistical Approach and Experimental Comparison of Immunochemical and Chromatographic techniques. *Journal of Analytical Toxicology*; 278-291; Vol. 18; September 1994.
35. SALVADOR ALVARADO GARIBALDI. *Jóvenes y Drogas*. Procuraduría General de la República. México 1994.
36. TEASE G. E., EVANS W. H. *Tratado de Farmacognocia*. Capítulo 35: Alucinógenos, Alergénicos, Teratógenos y otras Plantas Tóxicas. Editorial Interamericana. 12ava. Edición. México, 1987.
37. VANDANA DIXIT and VYAS M. DIXIT. Solid-phase extraction of 11-nor-D-9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid from human urine with Gas Chromatography-Mass Spectrometric Confirmation. *Journal of Chromatography*; 81-91; 567, 1991.
38. WILLIAM E. BRONNER and ALLAN S. XU. Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Methods of Analysis for Detection of 11-NOR-D-9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid in Biological Matrices. *Journal of Chromatography*; 63-75; Vol. 63-75; 1992.