

50524
32



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

"INVESTIGACION QUIMICA EN MUESTRAS ESTOMACALES PARA
CASOS DE INTOXICACION CON BENZODIACEPINAS"

T E S I S

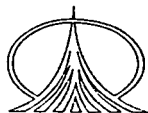
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA

DOMINGUEZ YERENA NORMA LUCIA

ASESOR: PROF. QFB VALENTIN ISLAS PEREZ

MEXICO D. F.

2003



1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A DIOS, por permitirme vivir para
disfrutar de estos momentos
y por todo lo que me ha dado.

A mi familia, por lo que significa su apoyo
para mi crecimiento personal y profesional
por que sin ellos posiblemente
no hubiera llegado a la meta.

A mis amigos, por compartir sus conocimientos
y tantos buenos momentos en la escuela y en la vida;
por su amistad sin fronteras ni condiciones.

2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

Para ti, *ALFREDO*

Porque has sido parte importante en mi trayectoria
quiero compartir y dedicarte mi trabajo,
por que en muchas ocasiones te preocupaste
y te ocupaste por como iba en la escuela,
por tus palabras de apoyo y creer en mí,
por que has sido motor
para mí crecimiento personal y profesional

Hoy quiero darte las Gracias
por que a tu lado he aprendido muchas cosas
incluso sobre mí, por tu tiempo, tu paciencia, tu amistad,
por enseñarme lo fuerte que soy
y lo débil que puedo ser,
por la intensidad de todos estos días,
por existir en esta vida y en mi destino.

IKORMI A



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Si oyes en la noche la voz
de la soledad y el rumor
que ha llegado el tiempo
de ser dos....Aquí estoy!!!

Ten mi mano, apriétala bien
Ten mi hombro, apóyate en él,
y a donde nos lleve el viaje iré
contigo iré.

Y en tu descanso seré el reposo
y en tu camino seré el andar
y al sol mandé avisar a la brisa
que haga saber, nuestro caminar.

No es más rico
el que tiene más
sino el que menos
ha de necesitar.

Y si tu tienes a alguien
Junto a ti...rico serás.

Una mirada bastará
una palabra servirá
para poner mi corazón en pie
¡¡Aquí está!!

TABLA DE CONTENIDO

GLOSARIO	3
INTRODUCCIÓN.....	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
OBJETIVOS.....	7
I. CLASIFICACION MEDICO-LEGAL DE LAS INTOXICACIONES CON BENZODIACEPINAS.....	8
1. MARCO TEÓRICO.....	8
2. TOXICOLOGIA.....	73
2.1 Propiedades Generales de Absorción, Distribución y Eliminación.....	13
2.2 Metabolitos.....	20
2.3 Dosis Letales, Terapéuticas y margen de seguridad.....	24
2.4 Efectos tóxicos en Sistema Nervioso Central.....	28
3. PROPIEDADES QUÍMICAS DE LAS BENZODIACEPINAS.....	32
II ASPECTOS CRIMINALISTICOS	39
1. Tipos de Muestra.....	39
2. Recolección, embalaje y envfo.....	43
3. Estabilidad Química en Fluidos.....	47
4. Pruebas preliminares.....	50
III ANÁLISIS QUÍMICO TOXICOLOGICO DE LAS BENZODIACEPINAS	61
1. Muestras sin historia.....	61
2. Muestras con historia.....	63
3. Procesamiento de la muestra.....	64
4. Análisis cualitativo.....	68
5. Análisis cuantitativo.....	71
6. Discusión.....	76
IV. BIBLIOGRAFIA	79

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GLOSARIO

BZ1	Se refiere al Receptor benzodicepínico de tipo 1
DMF:	Dimetilformamida
DMSO:	Dimetilsulfoxido
EMIT:	Técnica de inmunoensayo de enzima multiplicada
EC-GLC:	Cromatografía de gases-líquido con detector de captura de electrones
Pg:	Picogramos
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GLC:	Cromatografía de gases líquido
HPLC:	(High Performance liquid Chromatography) Cromatografía de líquidos de alta resolución
Hr:	Hora
IM:	Intramuscular, se refiere a la vía de administración
IV:	Intravenosa, se refiere a la vía de administración
Min:	Minutos
ngml ⁻¹ :	Nanogramos por mililitro
Ni ECD	Detector de captura de electrones de níquel
Rf's:	Migración relativa en cromatografía de capa fina
SEMEFO:	Servicio Médico Forense
Silica gel G o GF con proveedores	Se refiere al tipo/grado o tamaño de silica que se utiliza, consultar
SNC:	Sistema Nervioso Central
TLC	(Thin Layer Chromatography) Cromatografía en capa fina
UV	Ultravioleta

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

Las benzodiazepinas son un grupo farmacológico relativamente extenso, con variedad de efectos (ansiolíticos, relajantes musculares, sedantes), amplias posibilidades terapéuticas, de frecuente prescripción por la fácil administración, sin violencia en su consumo y reducidos precios en general, por lo que son el grupo de psicofármacos que con mayor frecuencia se ve envuelto en casos de intoxicación, que al igual que cualquier otra sustancia puede darse de cuatro formas: tanto voluntaria (suicida) como accidental, incluso utilizadas, si no con fines homicidas, si como medio de cometer delitos previa administración a incautas víctimas, y la de suplicio debido a que las altas dosis provocan la depresión completa y la muerte.

El esclarecer la etiología de las intoxicaciones o bien de aportar la prueba del crimen o envenenamiento han sido tarea de la toxicología, que junto con la química legal ha permanecido siempre estrechamente unida en su labor por auxiliar a la justicia, así la investigación toxicológica es el conjunto de procesos analíticos que tienen por objeto el aislamiento, identificación y la determinación cualitativa y cuantitativa de los tóxicos, y que desde el punto de vista analítico es la misma en todas sus ramas, por lo que los métodos para detectar un veneno parecen ser simples o lógicos pues existen técnicas analíticas como pruebas de color, espectrofotometría ultravioleta-visible, cromatografía de gases y/o líquidos, etc., que nos ayudan a resolver estas incógnitas; sin embargo, el

análisis toxicológico-legal tiene algunas peculiaridades como es la amplitud y profundidad del mismo, el tiempo para la presentación e interpretación de resultados, aunado a que la sustancia problema puede ser un líquido orgánico, porciones de tejido, comprimidos medicamentosos, restos líquidos, algunos vegetales o polvos, y en muchas de las ocasiones no es especificado el nombre del veneno, por lo que los requerimientos de prueba se convierten en un problema para el químico, ya que no hay un método de análisis capaz de detectar toda la variedad de venenos. Esto sin dejar de lado el carácter ético que implica el manejo de datos y evidencias que involucran la libertad de un delincuente o la prisión de un inocente, problemas con los que también tiene que ver el químico.

En la investigación de benzodiazepinas en muestras estomacales, no es menos engorroso el camino, ya que las características propias de la muestra, como es el contenido de proteínas, alimentos y otros contaminantes en ella, dificultan la tarea de la identificación, aislamiento y cuantificación del tóxico, sin embargo, se reportan algunas técnicas analíticas rápidas o bien llamadas pruebas presuntivas, como la prueba de Bratton Marshall, la cromatografía de capa fina, inmunoensayo, espectrofotometría ultravioleta entre otras, que nos permiten identificar la presencia de estas en el fluido. De la misma manera al someter la muestra obtenida a técnicas específicas de extracción para el aislamiento de las benzodiazepinas podemos remitirnos a métodos analíticos

específicos como la cromatografía de gases o líquidos acopladas a masas, para su confirmación y cuantificación como se reporta en este trabajo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la intoxicación con benzodiazepinas aparece en alrededor del 40% del total reportado y un alto porcentaje de estas, está relacionada con la comisión de un delito, surge la necesidad de buscar tanto técnicas analíticas factibles de aplicar en el momento de obtención de una muestra, que nos permitan centrar la atención en este grupo de tóxicos, como métodos cuantitativos fiables para confirmar y cuantificar la presencia de las benzodiazepinas en muestras estomacales, así como embalar las muestras adecuadamente para remitirlas al laboratorio, de forma que no pierdan utilidad; y de esta forma facilitar el análisis de laboratorio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

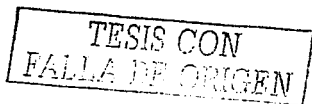
OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar una investigación bibliográfica sobre las pruebas de campo, tratamiento y análisis que deben efectuarse a muestras estomacales en casos de intoxicación con benzodicepinas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el método adecuado de embalaje, remisión al laboratorio y almacenamiento de las muestras estomacales obtenidas en casos de intoxicación con benzodicepinas.
2. Investigar las pruebas analíticas rápidas presuntivas a realizar durante la toma o recolección de muestras estomacales para orientar a una posible intoxicación con benzodicepinas.
3. Identificar las técnicas analíticas a emplear para la confirmación y cuantificación de benzodicepinas contenidas en muestras estomacales.



I. CLASIFICACION MEDICO-LEGAL DE LAS INTOXICACIONES CON BENZODIACEPINAS.

1. MARCO TEÓRICO

Con el desarrollo social, económico y poblacional de México las ciudades se han transformado en conglomerados complejos y en consecuencia aquellos problemas relacionados al consumo de alcohol, drogas lícitas e ilícitas, también se han incrementado, colocándose entre las principales causas de mortalidad y morbilidad; entendamos por drogas lícitas a aquellos fármacos que son administrados para el tratamiento de enfermedades, que en un menor o mayor grado pueden causar adicción o dependencia debido a sus efectos terapéuticos o secundarios y que en determinado momento se pueden convertir en tóxicos potenciales si no se medican bajo estricta vigilancia.²⁶

La distribución del consumo de drogas entre la población de 12 a 65 años representa sólo el 4.8%, de los cuales el 8.5% son hombres de entre los 12 y 34 años de edad, frente al 2.2% de las mujeres en las mismas condiciones, datos que nos refieren que por cada tres hombres existe una mujer consumidora.²⁶

Es evidente que las intoxicaciones por medicamentos ocupan uno de los primeros lugares en cuanto a frecuencia y peligrosidad se refieren, entre todas las que se producen en nuestro ambiente. Pero hay que señalar que especialmente estas

intoxicaciones medicamentosas, van afectar a dos grupos principales de fármacos: los analgésicos-antiinflamatorios y los psicofármacos, (entendiendo por psicofármacos aquellos utilizados para el tratamiento o prevención de enfermedades psiquiátricas, sin referirnos a otros que puedan ejercer una acción sobre el SNC; dentro de esta definición se encuentran agrupadas las benzodiazepinas, incluyendo todos los fármacos del grupo relativamente extenso). Las benzodiazepinas no sólo son los psicofármacos más ampliamente utilizados a lo largo del planeta, sino quizás uno de los grupos farmacológicos de mayores ventas, hacia 1990 tan sólo en Estados Unidos se hallaban comercializadas doce benzodiazepinas distintas (cinco de ellas de acción prolongada y siete de acción corta), mientras que en el mercado español eran 26 las existentes, lo que puede dar una idea del crecimiento desmesurado que ha tenido este grupo farmacológico.³

Hacia el año 1987 las benzodiazepinas supusieron siempre más del 50% del total de las intoxicaciones por psicofármacos atendidas, considerándose estas como drogas de abuso. En 1988 se lanza el proyecto ENA (Encuesta Nacional de Adicciones), con lo que se permite tener datos estadísticos del número de consumidores de las principales drogas; así, hacia 1990 la SEMEFO reporta que el 27% de los homicidios se relaciona con el uso de alguna droga, mientras que el 41% de los casos de suicidio se debe al consumo de las mismas.²⁶

Las benzodiacepinas son ampliamente utilizadas en nuestro medio, de fácil administración, de frecuente prescripción por sus amplias posibilidades terapéuticas, y reducidos precios en general, por todas estas razones es el grupo de psicofármacos que con mayor frecuencia se ve envuelto en casos de intoxicación, tanto voluntaria, como accidental, e incluso utilizadas, si no con fines homicidas, sí como medio de cometer delitos, previa administración a incautas víctimas.¹

Si tenemos en cuenta su etiología médico legal (Fig. 1) vemos que son inexistentes los intentos de homicidio por estos fármacos, destacándose sin embargo, los intentos de suicidio (entre los adultos) frente a los accidentes (sobre todo en niños).¹

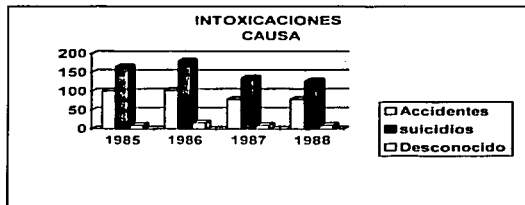


FIG. 1 ETIOLOGÍA MEDICOLEGAL R03

Al igual que las benzodiacepinas, existen otros fármacos que se ven involucrados en las distintas etiologías médico-legales, como los antidepresores, sin embargo las benzodiacepinas figuran en primer lugar en cualquier tipo etiológico (fig. 2) :

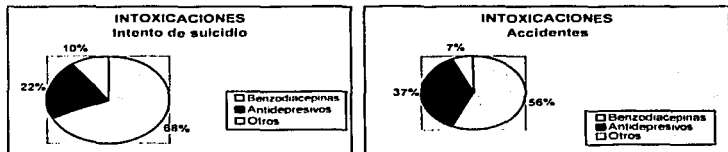


FIG. 2 ETIOLOGIAS MEDICO-LEGAL EN DONDE PREDOMINA EL USO DE BENZODIACEPINAS (n=7)

Atendiendo a la distribución de las intoxicaciones por sexo y edades (fig 3), se observará que estas se presentan en mayor grado en las mujeres adultas frente a los varones, predominando las intenciones de suicidio, mientras que para las intoxicaciones accidentales o sin causa autolítica, la proporción es inversa presentándose en un 3% para las mujeres y un 5.4% para los hombres; entre los niños menores de 10 años este predominio benzodiacepínico es menor, cosa lógica si tenemos en cuenta el carácter accidental de la intoxicación y no la elección de un determinado fármaco para fines supuestamente autolíticos, sin embargo, sigue prevaleciendo entre otros fármacos debido a su mayor consumo y, por tanto su presencia más habitual en el botiquín casero. 1

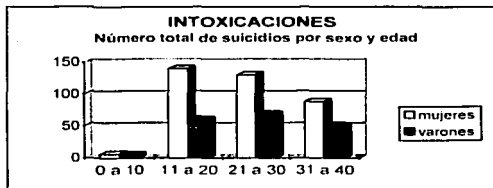


Fig 3 Distribución por edades y sexo del uso de benzodiazepinas. Ref 3

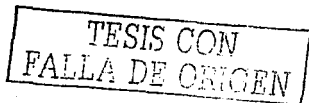
Estos datos muestran una clara tendencia sin embargo, es necesario confirmar con más estudios estadísticos estas frecuencias para establecer las líneas epidemiológicas que permitan ejercer de forma más práctica y notable una verdadera toxicovigilancia de estos fármacos, cada día en mayor cantidad envueltos en intoxicaciones.

2. TOXICOLOGIA

2.1 Propiedades Generales de Absorción, Distribución y Eliminación.

Las benzodiazepinas habituales poseen varias acciones farmacológicas que amplían el campo de sus posibilidades terapéuticas. De este modo, aunque comenzaron siendo principalmente sedantes y ansiolíticos menores en la actualidad algunos fármacos del grupo son hipnóticos de elevada eficacia, anticonvulsivantes aceptables o inductores anestésicos de utilidad. Junto a estas acciones no hay que olvidar que fármacos como el diazepam, desde su comienzo se han utilizado como relajantes musculares eficaces.¹

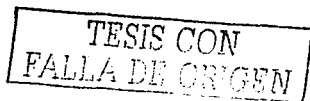
La absorción de las benzodiazepinas por vía oral es en general, aceptable o incluso buena, aunque el tiempo oscila dependiendo de cada fármaco entre la media hora o las seis u ocho horas. Así por ejemplo, el Prazepam, Clonazepam, Temazepam y Oxacepam se absorben lentamente, mientras que otros fármacos, como el Diazepam, lo hacen con más velocidad alcanzando la concentración plasmática máxima al cabo de una hora cuando se administra a adultos, o incluso en 15 ó 30 minutos en niños. " En un lugar intermedio se sitúan el Lorazepam, Halazepam y Clordiazepóxido, con excepción del Clorazepato que no se absorbe por completo ya que se dextracarboxila con rapidez en el jugo gástrico hasta N-desmetildiazepam (nordazepam) y a continuación se absorbe por completo, la velocidad de descarboxilación decrece con el incremento del pH gástrico."¹



La absorción por vía intramuscular, pese a lo que pudiere suponerse, es errática o aleatoria y algo lenta alcanzándose niveles inferiores en sangre que los obtenidos por vía oral; además es preciso mencionar que la inyección intramuscular suele ser dolorosa. La excepción a esta regla la dan los fármacos como el Midazolam, Clorazepam o el Lorazepam, cuya absorción tras utilizar esta vía, suele ser rápida y prácticamente completa. La vía rectal es de utilidad cuando se emplea el Diazepam especialmente en niños, aunque su farmacocinética no ha sido determinada las evidencias sugieren que es probable una rápida absorción.¹¹

En general, la administración oral de benzodicepinas produce efectos ansiolíticos, relajantes musculares y anticonvulsivantes tras la primera dosis. La vía intravenosa presenta notables ventajas en cuanto a rapidez se refiere, aunque por regla general la duración de los efectos (al margen de la vida media de cada fármaco) suele ser menor por esta vía que por otras.

En el caso del Lorazepam los efectos aparecen también en breve plazo (1 a 5 minutos) pudiendo permanecer hasta pasadas 12 a 14 horas si se utiliza la vía intravenosa, mientras que si utilizamos la vía intramuscular dichos efectos tardarían en aparecer un poco más (entre 15 y 30 minutos) (Tabla 1).¹²



Vía de Administración	Aparición de la acción (min)	Duración del efecto (hr)
IV Intravenosa		
clordiazepóxido	1-5	15 min a 1h
Diazepam	1-5	15min a 1 h
Lorazepam	1-5	12-24
Midazolam	1-5	2-6
IM Intramuscular		
Lorazepam	15-30	12-24
Midazolam	5-15 y no más de 60	2h

Tabla 1. Rango de máxima concentración en suero, tiempo máximo siguiendo las diferentes rutas¹

Después de una inyección intravenosa de 0.1 mg/Kg de diazepam, el fármaco se distribuye rápidamente hacia el cerebro, pero a diferencia del tiopental tarda varios minutos en iniciarse la somnolencia, la concentración en el plasma disminuye a causa de la redistribución con un $t_{1/2}$ inicial de 10 a 15 minutos, sin embargo vuelve a aparecer la somnolencia después de 6 u 8 horas con una concentración de diazepam en plasma aumentada, este efecto se debe probablemente a la absorción desde el tubo digestivo después de la excreción por la bilis. El clordiazepóxido y el flurazepam son benzodiazepinas que tienen una biotransformación rápida en intestino antes de ser absorbidas "

Las benzodiazepinas se distribuyen ampliamente en todos los tejidos, cruzando la barrera hematoencefálica y placentaria, por lo que se puede encontrar a la mayor parte de ellas en la leche materna, y es posible encontrar niveles en sangre fetal iguales o ligeramente superiores a los de la sangre materna. "12

En la forma no ionizada todas tienen coeficientes altos de distribución en lípidos y agua, de todas maneras su lipofilia varía más de 50 veces según la polaridad y electronegatividad de los diversos sustituyentes. Para la mayor parte de los fármacos del grupo el volumen de distribución oscila habitualmente entre 1 y 3 litros por kilogramo de peso. "

Las concentraciones de benzodiazepinas y sus metabolitos en plasma varían de manera considerable de unos pacientes a otros, siendo muy difíciles de definir sus concentraciones o niveles terapéuticos en plasma, al menos de una manera estadística; ambos se unen asimismo en gran proporción a las proteínas plasmáticas, variando el grado de unión entre un fármaco y otro debido a su solubilidad en lípidos entre un 70% (Alprazolam por ejemplo) hasta casi un 99% (Diazepam), sin embargo, pueden hallarse concentraciones del fármaco libre, no unido a proteínas plasmáticas, en líquido cefalorraquídeo muy similares que en plasma. "

Fármaco	Ruta de Administración	Dosis mg	Concentración Máxima en suero ng·ml ⁻¹	Concentración Máxima en tiempo (hr)
Clordiazepóxido	Oral	25	370-2050	0.5-4
Clobazam	Oral	20	244-430	1-4
Clonazepam	Intravenosa	1.5	11.8-15.3	<1
	Oral	1.5	8.7-10.8	1-3
Diazepam	Intramuscular	10	43-149	1.5
	Oral	10	177-400	0.5-2
	Solución rectal	10	265-415	0.2-1
	Supositorio rectal	10	102-159	1.5-8
Flurazepam	Oral	90	40-80*	1
Flunitrazepam	Oral	2	10-12	1-2
	Supositorio rectal	--	--	
Lorazepam	Intramuscular	4	49.6-82.7	1-3
Osazepam	Oral	15	119-190	1-4

Tabla 2 Vías de administración, dosis y concentraciones en sangre. *Los datos se refieren a N-desalquilflurazepam

Seguido a la administración intravenosa del Clordiazepóxido o Diazepam y la fácil absorción de estos, la concentración de la droga en plasma declina rápidamente por la distribución en los tejidos. Una fase de redistribución debido a la solubilidad lipídica de las benzodiazepinas, ocurre en órganos con gran perfusión especialmente músculo y tejido adiposo, así la redistribución es más rápida para los fármacos con más alta solubilidad en lípidos. "

La vida media de eliminación de las benzodiazepinas es muy variable depende de cada fármaco y de la existencia o inexistencia de metabolitos activos. Así por ejemplo el Halazepam tiene una vida media en sangre entre las 2 y 4 horas, pero sus efectos son

mucho más prolongados porque posee un metabolito activo el nordiazepam, cuya vida media es de unas 30-200 horas Este es a su vez metabolizado a otro metabolito activo, el Oxazepam, que prolonga más los efectos del medicamento administrado. (Tabla 3)¹¹

Fármaco	Volumen de distribución (V _d) l/Kg	Tiempo de Vida media t _{1/2} hr	Metabolitos activos
Clordiazepóxido	0.26- 0.58	6- 28	Desmetilclordiazepóxido, desmetildiazepam, oxazepam
Clobazam	ND	9-30	Desmetilclobazam
Clonazepam	2-4.8	24-48	
Diazepam	0.95- 2	20-70	Desmetildiazepam
Flurazepam	3-4	51-100	N-desalquilflurazepam
Flunitrazepam	2.5-3	20	7-aminoflunitrazepam
Nitrazepam	1.5- 2.76	18-31	
Lorazepam	0.7 -1	12.6	
Oxazepam	0.6	7.3-8.3	

Tabla 3 Rangos de Volumen aparente de distribución, tiempo de vida media y metabolitos activos. ND no disponible

Los pacientes obesos tienen prolongada la vida media de eliminación, por lo menos del Diazepam o desmetildiazepam, los enfermos hepáticos y los ancianos también poseen una vida media de eliminación aumentada para estos, y sus metabolitos a excepción del Lorazepam, Oxazepam, y Triazolam, también perduran más tiempo en la sangre de estos pacientes.)

Algunos de los compuestos benzodiazepínicos sufren un proceso de circulación entero-hepática, como es el caso del Diazepam, Nitrazepam, Bromazepam, pudiéndose encontrar en cantidades significativas del mismo en heces, aunque habitualmente mucho menores que las cantidades del mismo o de sus metabolitos que pueden hallarse en orina.¹⁰

Los metabolitos conjugados son eliminados principalmente por la orina, y en la misma es posible encontrar varios metabolitos diferentes, fruto de las distintas vías metabólicas empleadas o momentos diferentes del proceso. También suelen encontrarse, en general, pequeñas cantidades del producto administrado, en la orina lo que indica una eliminación del mismo desde el primer momento.³

2.2 Metabolitos.**

Las benzodiazepinas se metabolizan extensamente, principalmente por enzimas microsomales hepáticas; este metabolismo se produce en tres etapas principales (en el cuadro 1 se muestran estas y las relaciones entre los fármacos y sus metabolitos); en el caso de las benzodiazepinas que tienen un sustituyente en la posición 1 o 2 del anillo diazepina, la fase inicial y más rápida del metabolismo consiste en la modificación del sustituyente, eliminación del mismo o ambas cosas. Con excepción de aquellas benzodiazepinas que tienen un anillo triazolo o imidazol, la ruta suele conducir a compuestos N-desalquilados la mayor parte de los cuales son metabolitos activos, como es el caso de Nordiazepam, que es un metabolito procedente, de entre otros, del Diazepam, Prazepam, Halazepam y Cloracepato que es a su vez metabolito del Clordiazepóxido. "

La segunda etapa del metabolismo consiste en una hidroxilación en la posición 3 del anillo diazepínico, que también suele conducir a la aparición de metabolitos activos, como el Oxazepam, obtenido por hidroxilación del Nordiazepam. La tercera etapa viene representada por la conjugación de los compuestos hidroxilados, principalmente con ácido glucurónico y en menor proporción con ácido sulfúrico, estos conjugados invariablemente inactivos son excretados principalmente en orina. "

** Metabolito: producto del metabolismo por el cual el (los) fármacos son modificados en el organismo y puede ejercer o no un efecto positivo o negativo en el mismo. ref 11

Los productos, llamados en ocasiones compuestos *α hidroxilados*, son muy activos pero se metabolizan con gran rapidez, sobre todo por conjugación con ácido glucurónico, de modo que no ocurre acumulación apreciable de metabolitos activos en el organismo. ¹¹.

Fármaco	Metabolito Activo	Metabolito tóxico	Metabolito inactivo
Clordiazepóxido	N-desmetil clordiazepóxido		Oxazepam glucuronido
Clonazepam	---	7-amino clonazepam	7-amino clonazepam
Diazepam	N-desmetildiazepam		Oxazepam glucuronido
Oxazepam			3-glucuronido

Tabla 4 Ejemplo de algunos metabolitos de benzodiazepinas. Tomada de 1,10

El Clobazam es un ejemplo de las recientemente introducidas 1,5 benzodiazepinas (diferente de 1,4 benzodiazepina en la posición de los dos nitrógenos en el anillo diazepínico), tiene una vida media de 9 a 30 horas, se metaboliza de manera similar que las 1,4 benzodiazepinas y su principal metabolito farmacológicamente activo es el desmetilclobazam. ¹

El Clonazepam es reducido a 7-aminoclonazepam y acetilado a 7-acetamidoclonazepam ambos metabolitos son reportados como inactivos, del 25 al 30% son excretados en la orina de forma libre y como conjugado glucurónico o sulfato

derivados. El nitrazepam es metabolizado por nitro-reducción a la amina correspondiente, seguido por una acetilación. ¹

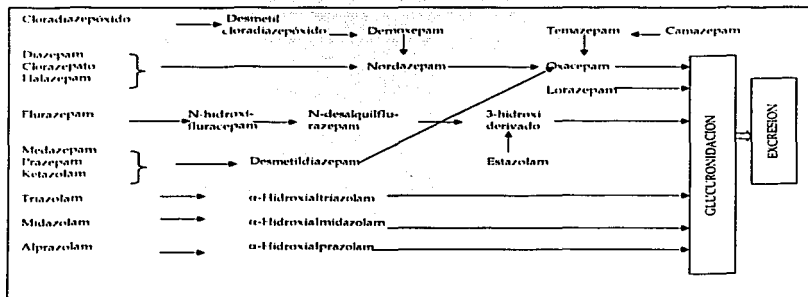
El flunitrazepam es metabolizado a través de varios pasos y sólo pequeñas cantidades de la droga sin cambio son excretadas, sus principales metabolitos son 7-amino, 3-hidroxi y derivados desmetil. ¹⁰

El flurazepam es rápidamente biotransformado a varios metabolitos, el mayor de ellos es N-desalquilflurazepam con un tiempo de vida media de 51-100 hrs y puede dar una larga respuesta de los efectos durante la terapia crónica. ¹⁰

El anillo triazol fusionado de estazolam carece de grupo metilo y se hidroxila sólo en grado limitado, la principal vía de su metabolismo consiste en la formación del derivado 3 hidroxilo. El midazolam se metaboliza con rapidez primordialmente por hidroxilación del grupo metilo del anillo imidazo fusionado; sólo se forman pequeñas cantidades de compuestos 3-hidroxilo, el compuesto α -hidroxilado que tiene actividad biológica apreciable se elimina con una vida media de una hora después de su conjugación con ácido glucurónico. ¹¹

Los anillos aromáticos A y C, (ver figuras posteriores), de las benzodiazepinas se hidroxilan sólo en grado pequeño; el único metabolismo importante en estos sitios es la reducción de los sustituyentes 7-nitro del Clonazepam, Nitrazepam y Flunitrazepam. Las aminas resultantes son inactivas y se acilan en grados variables antes de su excreción.»

Las concentraciones plasmáticas de los metabolitos con tiempos de vida media largos, pueden ser más grandes que la de las drogas sin cambio. Ketazolam y oxazolam son profármacos que se transforman metabólicamente en benzodiazepinas clásicas, mientras que Temazepam, Lorazepam y Triazolam, son en términos prácticos transformados en metabolitos inactivos.»



Cuadro 1. Relaciones Metabólicas entre algunas benzodiazepinas. Tomado de Goodwin and Calman

2.3 Dosis Letales, Terapéuticas y margen de seguridad.¹

Las benzodiazepinas se introdujeron por primera vez en medicina para el tratamiento de la ansiedad, y se han sintetizado hasta ahora un gran número de estos compuestos con propiedades sedantes, ansiolíticas, anticonvulsivas y relajantes musculares. Pueden producirse hipnosis y pérdida del conocimiento con grandes dosis de benzodiazepinas, y se han empleado con gran amplitud Diazepam, Lorazepam y Midazolam para la medicación preanestésica, para complementar o inducir y conservar la anestesia.^{10,11}

Las benzodiazepinas son fármacos con un amplio margen terapéutico, de modo que pueden administrarse aún a dosis altas con una relativa seguridad. De este modo es difícil alcanzar dosis tóxicas que supongan un gran peligro para la vida del intoxicado, siempre y cuando la intoxicación se haya producido sólo por benzodiazepinas.³

La dosificación de las benzodiazepinas debe ser cuidadosamente individualizada, y elegir las dosis efectivas más pequeñas en los pacientes geriátricos o debilitados para evitar la sobre sedación, al igual que en los pacientes con daño hepático (excluyendo Lorazepam y Oxazepam posiblemente en este último caso).³

¹Dosis letal: es la dosis que causa la muerte de un sujeto expuesto. Dosis letal 50 es la dosis que produce la muerte al 50% de la población expuesta, normalmente se refiere a la dosis por vía oral y única administración del fármaco. La dosis terapéutica es aquella que causa el efecto deseado en el paciente sin llegar a los efectos tóxicos. Margen de seguridad: es el rango de dosis que nos permite tener efectos deseados, aún excediendo las dosis, sin llegar a los efectos tóxicos. Ref 3

A causa de la naturaleza de la ansiedad las dosis pueden requerir frecuentes ajustes; la terapia con estas drogas generalmente debe estar limitada a no más de algunas semanas administrando la droga intermitentemente. ³

Inicialmente las benzodiacepinas orales son administradas en 3 o 4 veces diariamente para la ansiedad, relajación muscular y epilepsia, y en pacientes en los que existe un serio desorden la terapia no debe ser interrumpida de forma abrupta ya que es posible la precipitación de los síntomas o ataques. ¹⁰

Tabla 5 Dosis empleadas de algunas benzodiacepinas

Fármaco	Dosis sedativa ordinaria (mg)	Dosis extrema (mg)
Alprazolam	0.75-1.5	0.5-4
Clordiazepoxido	50-100 qd/qid	10-100, 25-30 (par)
Clonazepam	1.5-10	0.5-20
Clorazepato	3.75-20 bid qid	2-40
Diazepam	5-10 qid tid	
Flalazepam	60-160	20-160
Estazolam	1-2	
Flurazepam	15-30	
Lorazepam	2-4	1-10
Osazepam	15-30 tid qid	30-120
Quazepam	7.5-15	
Temazepam	7.5-30	
Triazolam	0.125-0.25	

qd: 1 vez al día, bid: dos veces al día, tid: tres veces, qid: cuatro veces, par: parenteral¹¹

En las dosis para complementar o inducir la anestesia las benzodiazepinas producen sedación y amnesia en 50% o más de los pacientes y su efecto puede durar hasta 6 horas, mientras que las grandes dosis pueden causar una disminución del 15 a 20% de la presión arterial general y de la resistencia vascular.¹⁰

Las dosis tóxicas son muy variables para cada fármaco de este grupo, en general son muy elevadas de forma que por ejemplo, se pueden ingerir hasta 0.5 gramos de Diazepam, ó 0.8 gramos de Clordiazepóxido sin sintomatología de extrema gravedad.¹

Se han establecido no obstante, una serie de niveles terapéuticos, tóxicos y fatales de benzodiazepinas en sangre, basados en una experiencia meramente estadística (tabla 6), ya que las dosis altas durante períodos prolongados puede causar síntomas más graves después de interrumpir el fármaco como agitación, depresión, pánico, paranoia e incluso convulsiones y delirio.¹

La sensibilidad del efecto depresor en el sistema nervioso central de las benzodiazepinas difiere en cada paciente por edad, sexo, estado físico y emocional y el uso concurrente de otras drogas pueden alterar las respuestas.¹⁰

Tabla 6 Niveles sanguíneos de benzodiacepinas (expresados en µg/ml)

Fármaco	Nivel terapéutico	Nivel tóxico	Nivel fatal
Bromazepam	0.08-0.15		
Clordacepoxido	1-8 y hasta 10	3-25	>20 ; 30
Clobazam	0.33		
Clonazepam	0.011-0.084	0.1	
Diazepam	0.05-2	1.5-15	>5 ; 20
Eflumitrazepam	0.01	>0.2	
Flurazepam	0.0005-0.0028, 0.01		2
Meflazepam	0.01-0.16		
Nitrazepam	0.026-0.066	0.2	
Oxacepam	0.05-2	>2	
Prazepam	0.09		
Tenazepam	0.35-0.85		
Tiazolam	5.5-16.7		

Tomado de: 3, 8

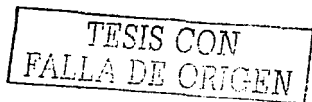
Durante los regímenes terapéuticos ordinarios, pocos individuos incrementan su ingestión sin instrucciones para hacerlo y son muy pocos los que manifiestan conducta compulsiva de búsqueda del fármaco al interrumpirle la ingesta por sus efectos psicóticos, varían las preferencias entre estos consumidores pero las benzodiacepinas más solicitadas son las de pronto inicio de acción como Diazepam y Alprazolam.¹⁶

2.4 Efectos tóxicos en Sistema Nervioso Central.

Por lo general, al menos en lo referente a las manifestaciones que pueden presentarse sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), los efectos secundarios no son sino una prolongación de los efectos farmacológicos normales, sin embargo son relativamente dosis-independientes y a pesar de los efectos secundarios es más frecuente o de mayor envergadura cuando se administra a dosis elevadas.¹⁶¹¹

Sobre el SNC se presentan los efectos secundarios con mayor frecuencia asociados al consumo de benzodiazepinas, destacando entre ellos la somnolencia además se han reportado efectos neurológicos o psiquiátricos entre los que se encuentran la depresión, fatiga, apatía, disminución de la actividad intelectual, desorientación temporo-espacial, crisis de llanto, delirio, irritabilidad y dificultad para la concentración.¹⁶¹²

Un síntoma de especial interés, por la actualidad del mismo es la anestesia anterógena, que se da al parecer con mayor frecuencia con algunos fármacos del grupo como Triazolam o incluso con el Midazolam. Los efectos secundarios suelen aparecer durante los primeros días de tratamiento y disminuyen con la continuación del tratamiento o tras la disminución de las dosis.¹⁶¹³



Existen reacciones paradójicas de estos fármacos que se caracterizan por ansiedad, inquietud, excitación, hiperactividad y accesos de furia especialmente frecuentes en la medicación de Nitrazepam y Flurozepam (generalmente en la primer semana de tratamiento).³

Habitualmente no se producen efectos cardiovasculares ni respiratorios graves a menos que se haya ingerido concomitantemente alcohol o fármacos depresores centrales, también es posible la aparición de estos efectos cuando se ha usado la vía endovenosa, tras una sobredosis accidental o suicida con frecuencia se produce ataxia, hipnosis, coma (sólo a dosis que rebasen el grado III) y excepcionalmente la muerte.¹⁰

Si la intoxicación progresa, las manifestaciones citadas van en aumento hasta producirse confusión, disminución de reflejos, hipotensión, trastornos cardiorrespiratorios de mediana intensidad y coma ligero habitualmente, sólo en raras ocasiones se produce una depresión neurológica mayor acompañada de depresión respiratoria central.¹

Se ha informado durante el uso de diversas benzodiazepinas una conducta hipomaníaca, hostilidad, furia, paranoia, depresión e ideación suicida. La intensidad y la incidencia de la toxicosis del SNC suelen incrementarse al avanzar la edad y participan factores tanto farmacocinéticos como farmacodinámicos.¹⁰

Aunque las benzodiazepinas tiene reputación de causar sólo una incidencia baja de abuso y dependencia, no debe soslayarse la posibilidad de esta complicación adversa con el empleo crónico.¹⁰³

Los pacientes que tienen antecedentes de consumo de sustancias o alcohol, son los más proclives a emplear estos agentes de manera inapropiada, y suele ocurrir abuso en el consumo de las benzodiazepinas como parte de un patrón de adicción a sustancias múltiples. Estos individuos rara vez prefieren las benzodiazepinas a los barbitúricos, pero a menudo las combinan para potenciar su efecto.¹⁰⁴

En algunas ocasiones se ha alegado el consumo de fármacos de este grupo para la comisión de delitos o de actos violentos, incluso se ha llegado a excusar la comisión de homicidios por el consumo de benzodiazepinas; en tales casos hay que obrar con extraordinaria cautela e intentar demostrar, cuando menos, que se ha producido dicho consumo si la ingesta es reciente, por los métodos analíticos más sensibles.¹⁰⁵

En la dosificación del Midazolam por ejemplo, los efectos adversos en SNC son extensión de las acciones farmacológicas y también presenta reacciones paradójicas debido a desordenes iatrogénicos, esto se ha reportado en el 2% de los pacientes que recibieron la droga, una excesiva sedación ocurre en el 1-2% de los pacientes posterior a la administración parenteral del midazolam.¹⁰⁶

Muchos autores señalan la importancia de la etiología suicida de estas intoxicaciones, y se ha podido constatar que entre todos los intentos de suicidio por psicofármacos en el período de 1983 a 1987, la mayor parte de los mismos se produjeron por ingesta de benzodiazepinas en un porcentaje que osciló entre el 58% en 1987 y 69% en 1993. El etanol contribuye en forma frecuente a las defunciones en que participan las benzodiazepinas y no es raro el coma verdadero en ausencia de otro depresor del SNC.¹

Los síntomas asociados al consumo crónico de benzodiazepinas son hasta cierto punto parecidos a los que pueden presentarse en idénticas circunstancias con los barbitúricos o el alcohol, así se ha podido comprobar un ligero efecto euforizante que no suele aparecer con el abuso de barbitúricos o alcohol. La dependencia que provocan las benzodiazepinas es sin embargo, parecida a la nicotina.¹¹⁶

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

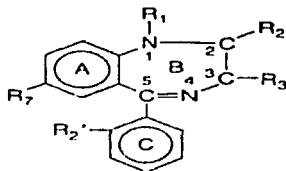
3. PROPIEDADES QUÍMICAS DE LAS BENZODIACEPINAS

Las benzodiazepinas se encuentran formadas por una estructura común para todas ellas a las que se agregan diferentes radicales. Esa estructura común se halla compuesta por un anillo de benceno (A), unido a otro de diazepina (B) de siete miembros, casi todas las benzodiazepinas de importancia tienen una sustitución 5-arilo (anillo C) en el segundo anillo de benceno, y un anillo 1,4-diazepina, por lo que se pueden nombrar como 5-aril-1,4-diazepina. (Tabla 7) ^{11,12}

Sobre esta estructura genérica se han introducido multitud de variantes, como pueden ser la sustitución del anillo benzénico por otras estructuras heteroaromáticas como tieno (ejemplo Brotizolam), anillos triazólicos o imidazólicos en los radicales 1 ó 3 (tabla 7). Todo ello redonda en modificaciones de la actividad principal e incluso en la mayor o menor potencia del fármaco. Así los grupos aceptores de electrones en posición 2 en el segundo anillo benzénico aumentan la potencia, mientras que los sustituyentes en cualquier otro lugar disminuyen la actividad. ¹³

La sustitución del anillo C con una función ceto en la posición 5 y un sustituyente metil en la 4, son aspectos estructurales importantes del antagonista de la benzodiazepina llamado flunazetil. ¹⁴

CUADRO DE NOMBRES Y ESTRUCTURAS DE BENZODIACEPINAS



BENZODIACEPINA	R ₁	R ₂	R ₃	R ₇	R _{2'}
Alprazolam	[Anillo triazol fusionado]		-H	-Cl	-H
Brotizolam	[Anillo triazol fusionado]		-H	[anillo tiemo A]	-Cl
Bromazepam	-H	-O	-H	-Br	2(N)*
Clordiazepóxido		-NHCH ₃	-H		-H
Clobazam	-CH ₃	-O	-H	-Cl	-H
Clonazepam	-H	-O	-H	-NO ₂	-Cl
Clorazepato	-H	-O	-COO	-Cl	-H
Demoxepam	-H	-O	-H	-Cl	-H
Diazepam	-CH ₃	-O	-H	-Cl	-H
Estazolam	[Anillo triazol fusionado]		-H	-Cl	-H
Flumazenil	[Anillo triazol fusionado]		-H	-F	[=O EN C ₅]
Flurazepam	-CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	-O	-H	-Cl	-F
Halazepam	CH ₂ CF ₃	-O	-H	-Cl	-H
Lorazepam		-O	-OH	-Cl	-Cl
Midazolam	[Anillo triazol fusionado]		-H	-Cl	-F
Nitrazepam	-H	-O	-H	-NO ₂	-H
Nordazepam	-H	-O	-H	-Cl	-H
Oxazepam	-H	-O	-OH	-Cl	-H
Prizepam	-CH ₂ -CH / CH ₃	-O	-H	-Cl	-H
Quazepam	-CH ₂ CF ₃	=S	-H	-Cl	-F
Tenuzepam	-CH ₃	=O	-OH	-Cl	-H
Triazolam	[Anillo triazol fusionado]		-H	-Cl	-Cl

Tabla 7. Compuestos con sus radicales sustituyentes de la estructura básica de diazepam. *C-5 grupo proxi. Tomado de [10,11]

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las relaciones estructura-actividad más importantes pueden resumirse como sigue:

a) Anillo benzénico fusionado:

- Puede sustituirse por tiofeno, como en el clotiazepam.
- Los sustituyentes en la posición 7 deben ser aceptores de electrones, aunque no necesarios para la unión de los receptores. Los sustituyentes nitro pueden potenciar actividades hipnóticas y anticonvulsivas, como nitrazepam y clonazepam.
- Las sustituciones en otras posiciones del anillo benzénico dan resultados negativos.

b) Anillo de 1,4-diazepina:

- Es importante la función láctamica ya que el medazepam, por ejemplo es un profármaco que necesita activarse in vivo.
- La alquilación en 1, como ocurre en el diazepam o valium y en el prazepam, aumenta la lipofilia y la actividad.
- Las 3-hidroxi-1,4-diazepinas son metabolitos activos y la hidroxilación en la posición 3 se aplica al diseño de sustancias de rápida eliminación, útiles como hipnóticos, por ejemplo el oxazepam, lorazepam y lormetazepam.

c) Anillo benzénico en la posición 5:

- No es estrictamente necesario para la unión a los receptores y puede sustituirse por 1-ciclohexenilo, como en el tetrazepam, o 2 piridilo como el bromazepam.
- La halogenación en 2' favorece una conformación y lipofilia adecuadas para una mejor actividad biológica, por lo que está presente en muchos de los fármacos citados. 7

En el Clordiazepóxido, una 1,4-benzodiazepina-4 óxido, un grupo metilamino reemplaza la cetona en la posición 2 y un átomo de cloro está en R₇, en el alprazolam, Estazolam y Triazolam (triazolobenzodiazepinas) un anillo triazolo está formado por adición al núcleo del anillo benzodiazepínico en la posición 1 y 2, y un átomo de cloro en la posición R₇, el Triazolam tiene además un átomo de cloro en la posición R₂.¹⁰

La presencia del grupo trifluoroetil distingue al Halazepam y Quazepam, este último que además tiene un átomo de azufre, un fluor en R₂ y un cloro en el átomo R₇, de otras benzodiazepinas disponibles y resulta en la selectividad relativa para el receptor tipo 1 (BZ₁). En el Midazolam (una imidazobenzodiazepina), un anillo imidazol fusionado en las posiciones 1 y 2 del núcleo de las benzodiazepinas reemplaza la cetona de la posición 2 del núcleo, tiene un fluor en el átomo R₂ y un cloro en el átomo R₇. Las benzodiazepin-2-onas, pueden servir como ligando de iones metálicos ya se han caracterizado complejos con cloruro de cobalto, haluros de zinc y cadmio y con paladio

II. Los complejos formados con Bromazepam y sulfatos, cloruros, percloratos de varios iones divalentes, están siendo investigados recientemente.¹⁰²

Las benzodiazepinas pueden sufrir una serie de reacciones importantes, lo que da origen a la formación de sus metabolitos tanto activos como inactivos; por ejemplo hidrólisis como una ruptura del heterociclo nitrogenado.⁷



La glucuronación es la ruta de eliminación más importante para la mayoría de los fármacos, y la formación de los glucuronidos implica la inversión del carbono anómérico α del ácido glucurónico a la configuración β :



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Aunque es una reacción menos frecuente que la anterior por las escasas reservas de sulfato, la conjugación de aminas aromáticas es un proceso importante que compite con el anterior. En un primer paso, el ion sulfato se convierte en sulfato activo, 3-fosfoadenosina-5-fosfosulfato (PAPS) y es transferido entonces al sustrato por una sulfoquinasa. Al ser el sulfato un buen grupo saliente, estos metabolitos, especialmente los sulfatos derivados de hidroxilaminas aromáticas pueden estar implicados en reacciones toxicológicas.¹

En general todas las benzodiazepinas tienen un marcado carácter liposoluble, aunque ello varía notablemente de unos fármacos a otros del grupo. Los derivados benzodiazepínicos son drogas básicas las cuales son relativamente lípido-soluble y agua-insoluble a pH fisiológico. Además, esencialmente todas las drogas tienen un electrón donador sustituyente tal como un halógeno o un grupo nitro.¹²

Con algunas excepciones, las benzodiazepinas son térmicamente estables a muy altas temperaturas; esta combinación de propiedades le dan a la cromatografía de gases con detección de captura de electrones, la mayor sensibilidad y disponibilidad, para la cuantificación de derivados benzodiazepínicos en fluidos biológicos; no así para el clordiazepóxido y sus metabolitos, los cuales son térmicamente inestables y pobres candidatos a la cromatografía de gases.¹⁰

Estudios conformacionales del sistema 1,4-benzodiazepina, han demostrado que el anillo heptagonal adopta fácilmente dos conformaciones distintas (Fig. 6) de las cuales, sólo la primera es activa según se ha demostrado en los 3-metil derivados, en los cuales sólo el isómero de configuración S, que sitúa el metilo en posición ecuatorial por ser la conformación más estable y, por tanto es un modelo de dicha conformación, es activo.³

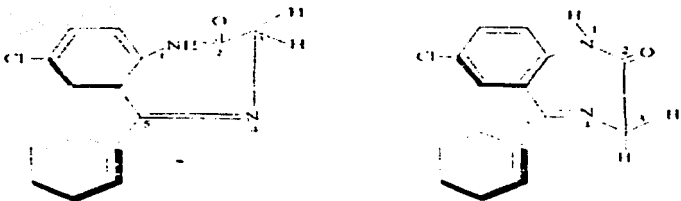


Fig 6 Conformaciones del anillo heptagonal de 1,4-benzodiazepinas. Ref 2

II ASPECTOS CRIMINALISTICOS

En sus orígenes la Toxicología forense fue fundamentalmente analítica y su campo de acción el cadáver, en la actualidad las funciones de esta rama de la toxicología son mucho más extensas proyectándose sobre el vivo, sobre el cadáver, la actividad laboral y sobre el medio ambiente. Ello determina la gran variedad de muestras con que puede encontrarse el toxicólogo forense; que debe ser capaz de detectar cualquier sustancia química exógena presente en el material biológico objeto de la pericia; así el gran número de sustancias tóxicas constituye una limitación importante y de hecho la mayoría de los laboratorios dirigen su investigación hacia aquellos tóxicos que, según las estadísticas, están implicados en la mayoría de los casos.⁴

1. Tipos de Muestra

La selección de las muestras adecuadas para el análisis y su correcta conservación, son requisitos indispensables en una investigación toxicológica; estas deben recogerse teniendo en cuenta las condiciones particulares de cada caso; aunque ciertas especies pueden estar siempre disponibles para los estudios toxicológicos. (En la tabla 8 se sugieren cantidades y tipos de muestras a recolectar).⁵²



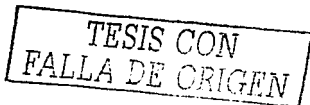
Tabla 8 Especímenes y cantidades sugeridas ha ser remitidas para la investigación toxicológica.

Espécimen	Cantidades mínimas	Indicaciones
Bilis	Todo el disponible	Importante en envenenamiento con narcóticos
Sangre	Tanto como sea posible o 20-30 ml	Para todo el tipo de determinaciones
Cerebro	100g	deseable en consumo de diazepam, flurazepam
Cabello	Aproximadamente 0.5g	En envenenamiento con arsenico
Contenido intestinal	30g	En circunstancias en que se cree que el tóxico fue tomado vía oral
Riñon	1	Todos lo tipos de envenenamiento
Contenido estomacal	Todo el disponible	Cuando el tóxico fue ingerido.
Orina	Toda la disponible	Para todos los tipos de drogas y venenos

Tomada de: Forensic Toxicology, Garrod C James R

Estas son la variedad de especímenes que pueden ser usados para los análisis toxicológicos, la elección final de los especímenes a enviar al laboratorio de toxicología dependerán y deben elegirse en función de las capacidades, recursos del laboratorio, procedimientos de rutina que se usen en él y de las circunstancias especiales. *

Tanto para el diagnóstico analítico como para el control de la evolución terapéutica de un enfermo intoxicado, las muestras más útiles son sangre, orina y contenido gástrico, aunque en casos concretos puede seleccionarse uñas, cabellos o heces fecales. Sin embargo es inútil e impráctico el requerir que todos estos especímenes sean recolectados en cada caso para ser analizados toxicológicamente. **



Muchos casos pueden ser evaluados adecuadamente, simplemente por pruebas de sangre, con tal que el laboratorio use técnicas con las cuales pueda recobrar y cuantificar drogas en sangre en cantidades esperadas después de las dosis terapéuticas, las concentraciones de éstas y casi todos los tóxicos son más significativas que en cualquiera de los especímenes. Las cantidades trazas de una droga en sangre pueden no ser usualmente confirmadas.*

El hígado concentra muchas drogas y sustancias tóxicas, ya que es aquí donde son metabolizados, en una sobredosis pueden ser detectadas altas concentraciones de la sustancia en este órgano; el cerebro es frecuentemente recuperado para las pruebas toxicológicas, aunque no son encontradas muchas drogas y las concentraciones son mucho menores que en sangre. **

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

El contenido estomacal es primeramente valorado para estimar la cantidad ingerida en graves sobredosis, e identificar cualitativamente sustancias que han sido recientemente ingeridas. Es ciertamente buena evidencia para la ingestión de drogas con intenciones suicidas, mientras que una muy baja concentración puede indicar una sobredosis accidental, especialmente cuando se asocian con una historia de abuso de drogas.*

Pequeñas cantidades de contenido intestinal pueden ser analizadas si el contenido estomacal no está presente, o para la asistencia en la evaluación de la dosis ingerida, el contenido intestinal puede rendir grandes cantidades de la droga después de la sobredosis, cuando poca este presente en el estomago.*

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

2. Recolección, embalaje y envío.

Idealmente los médicos examinadores en sus agencias deben entregar el espécimen al laboratorio toxicológico suministrando la información pertinente, los especímenes para otras agencias con fines forenses deben ser enviados de forma tal que la cadena de custodia pueda ser establecida para fines de juzgado, si es necesario.²²

Los tribunales o juzgados comunicarán al laboratorio el envío que haya efectuado expresando la fecha de expedición, procedimiento utilizado, nombre del transportista y breve descripción del paquete; la muestra debe ser acompañada por el uso de una forma escrita con una breve descripción del espécimen y su precintado (etiqueta); así mismo se expondrá con la mayor claridad y concisión posible el tipo de investigación que interesa y se acompañará información de todos los datos clínicos, necróticos, procesales, juzgado de instrucción, número de investigación y otros complementarios que puedan tener interés para la investigación.²³

El éxito de la investigación toxicológica se encuentra estrechamente ligado a la calidad, cantidad y grado de conservación de las muestras que se remitan, por lo que al momento de que el patólogo forense hace la recolección de la muestra es necesario tener en cuenta los siguientes criterios y la elección del tipo de muestra se hace mucho más sencilla:

- 1) Tipo de veneno sospechado
- 2) Vía de absorción del tóxico
- 3) Carácter agudo o crónico de la intoxicación.

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

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

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

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

De esta forma, por ejemplo la elección de una muestra de contenido estomacal debe considerarse cuando el veneno o tóxico fue ingerido por vía oral en grandes cantidades. Las ventajas que presenta el trabajar con este tipo de muestras es que se pueden encontrar drogas sin cambio, la identificación es relativamente simple, mientras que las desventajas que presenta son que el análisis sólo es cualitativo y pueden emulsificarse las muestras cuando son sometidas a extracciones.*

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

y permitiendo que el contenido salga por gravedad. Algunos laboratorios solicitan la pared del estomago, ya que los restos de polvos o tabletas permanecen adheridos en altas concentraciones en los pliegues de la mucosa.¹⁰

El tiempo que el patólogo o el perito responsable toma para embalar, identificar y enviar o remitir la muestra también es un factor importante en la emisión de los resultados, ya que durante el proceso el tóxico o la muestra en sí, puede sufrir deterioros causados por las condiciones climáticas y las inherentes a la degradación natural de las muestras biológicas, por lo cual se debe establecer no sólo las condiciones de temperatura (uso de sustancias refrigerantes) y exposición al ambiente, sino también el tiempo máximo permitido para la remisión-recepción-análisis de la muestra.¹¹

No han sido establecidos tiempos y temperaturas de conservación de las muestras, sin embargo al tratarse de una muestra de origen biológico se debe considerar que el mantenerla a baja temperatura retardará el efecto de descomposición natural, por lo que sería necesario recurrir al uso de refrigerantes para el transporte sin necesidad de llegar a la congelación, y al momento del análisis tomar en cuenta que el proceso natural de descomposición puede presentarse desde las dos primeras horas.^{10,11}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

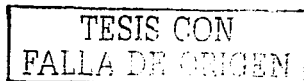
Los documentos que se generan en la recepción y análisis de las muestras deben retenerse por un mínimo de 6 meses, al término del período una lista de estos debe ser emitida a los remitores y se solicitará el permiso para ser destruidas.¹⁴

3. Estabilidad Química en Fluidos

Uno de los factores que debe ser considerado en la interpretación de resultados toxicológicos, es la validez de los mismos para la prueba y para ello debemos tomar en cuenta factores como la eficiencia del método de extracción para la identificación y cuantificación del tóxico y el deterioro que puede sufrir éste durante su almacenamiento.¹⁵

Por ejemplo, las benzodiazepinas (clonazepam, nitrazepam, triazolam) pueden descomponerse durante el almacenamiento de muestras de sangre o hígado a 4°C y se ha encontrado que el cloridazepóxido se deteriora en sangre total en aproximadamente de 1 a 6 de la concentración inicial al ser evaluado en una muestra sometida a refrigeración a 3°C por 18 días. ¹⁶

En 4 días se ha deteriorado la mitad de la concentración original en una muestra de sangre, mientras que por otro lado permanece sin cambio en una muestra de suero; a



diferencia del diazepam y flurazepam que muestran una relativa estabilidad al ser analizados a los 7, 30 y 120 días, (fig 7)*

Día	Concentración de clordiazepóxido µg/ml		
	0	5	19
Sangre total	0.6	0.6	3.3
Suero	2.09	---	21.7

Fig. 7. Tabla de resultados de análisis de muestra de paciente muerto por sobredosis. La concentración en tiempo cero se determinó solo en suero.

Día	fármaco	Concentración en µg/ml			
		0	7	30	120
	Diazepam	1.0	0.97	0.99	0.87
	Flurazepam	1.0	0.93	0.93	0.78

Fig. 7. Las muestras fueron preparadas con 1.0 µg/ml y se analizaron por cromatografía de gases. Toxicol. Toxicology 9

La luz es uno de los factores que pueden acelerar este mecanismo de descomposición, ya que casi todos los fármacos pertenecientes a este grupo (benzodiazepinas) son fotosensibles, por lo que se recomienda emplear frascos ámbar o cubrirlos con papel aluminio, incluso el material utilizado durante el análisis; así como utilizar contenedores de cierre hermético pues muchos de ellos son higroscópicos.²¹

El midazolam es uno de los más estables del grupo, el anillo imidazol le confiere habilidad de formar sales que incrementan su solubilidad y estabilidad a la hidrólisis, la presencia del grupo metilo en la posición 1 del anillo de imidazol puede resultar en la susceptibilidad al metabolismo, a pH fisiológico el fármaco se encuentra en la posición

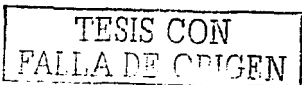
cerrada del anillo lo que incrementa la lipofilicidad, que decrece con el descenso del pH, además de sufrir hidroxilación hepática.™

El quazepam es altamente distribuido en el cuerpo y fluidos, se han recuperado altas concentraciones en el hígado y riñón, 24 horas después de la administración y estas exceden a las encontradas en plasma, pequeñas cantidades son excretadas en orina sin cambio.™

El cloraxepato se descarboxila con rapidez en el jugo gástrico y posteriormente se absorbe, es inestable en soluciones acuosas y sufre degradación en presencia de humedad resultando en la formación de dióxido de carbono.*

El diacepam es inestable en soluciones ácidas diluidas y en álcalis concentrados, por lo que el valor de pH en el estomago*, genera su rápida degradación a los metabolitos correspondientes con una mayor vida media y por tanto su absorción.™

* (se encuentra entre 1 y 2, mientras que todo el tracto intestinal se encuentra desde 1 hasta 7.5 tomando en cuenta todos los segmentos de tracto intestinal)



4. Pruebas preliminares.

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

De esta forma la tarea del analista se ve facilitada, pues dirigirá su análisis hacia un un tóxico o grupo de tóxicos en específico disminuyendo tiempos, gasto de reactivos y materiales; obviamente cuando se cuenta con información, cualquiera que sea la fuente, de cómo sucedió la intoxicación, la sistemática se vuelve aún más sencilla por que sólo sería necesario confirmar la presencia del tóxico.*

Dentro de las pruebas rápidas, también llamadas presuntivas, que se pueden realizar al momento de recolectar la muestra por que no requieren del uso de equipo o materiales sofisticados se encuentra la de desarrollo de color con el reactivo de Dragendorff que consiste en nitrato de bismuto en ácido clorhídrico 10M, disuelto en

una mezcla acuosa de yoduro de potasio; la muestra es disuelta o acidificada con ácido clorhídrico (3 gotas) 2M y se le adiciona de 2 a 3 ml de reactivo presentándose una coloración naranja, que sugiere la presencia de aminas primarias, secundarias y terciarias, así como cualquier base nitrogenada, por lo que no es específica. »

Otra de las pruebas que se pueden aplicar consiste en adicionar a la muestra unos mililitros de reactivo de Marquis que es una mezcla de formaldehído y ácido sulfúrico concentrado dando como resultados el desarrollo de un color anaranjado para el diazepam y amarillo para el clordiazepóxido (dos drogas muy comunes en la intoxicación). »

Existen además pruebas con desarrollo de color para algunas benzodiazepinas pero en su presentación farmacéutica (tabletas), que valdría la pena mencionar y quizá en determinado momento evaluar la posibilidad de su aplicación a fluidos biológicos, por ejemplo: 1) A 10 mg de muestra se le adicionan 10 mg de tricetohidrinđeno hidratado reactivo y 5 gotas de etanol, se calienta en baño de agua por 2 minutos y adicione 5 ml de etanol, una solución azul es producida; a esta solución adicione 2 gotas de una mezcla compuesta de sulfato de cobre (II) y 3 ml de agua, se desarrolla un color rojo-naranja. »

2) Disuelva 10 mg de muestra en 15 ml de ácido clorhídrico TS, caliente por 15 minutos en baño de agua, enfríe y filtre, al filtrado adiciónale 0.2 ml de nitrito de sodio (10 g/l) y 0.2 ml de 2-naftol, un color rojo oscuro es producido lentamente.

3) Disuelva 10 mg de muestra en 1.0 ml de metanol R y adicione 0.1 ml de hidróxido de sodio (80 g/l) TS, se produce un color amarillo brillante. »

Muchas de las reacciones de identificación de los fármacos que tienen un agrupamiento amida o imida en su molécula se basan en la caracterización de los productos de su hidrólisis. Así la hidrólisis ácida de las 2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-2-onas conduce a los correspondientes derivados de la benzofenona, que son detectados por diazotización y acoplamiento con el reactivo de Bratton - Marshall (naftilendiamina) para dar un colorante azoico de color violeta. »

Prueba de Bratton Marshall:

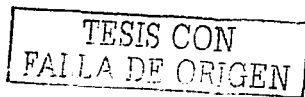
De todas las benzodiazepinas sólo el nitrazepam puede ser detectado por este método: a 4 ml de muestra adicione 2 gotas de ácido sulfúrico al 10% y dos gotas de solución de nitrito de sodio al 0.1% recientemente preparada, permita el reposo por medio minuto, adicione una gota de solución de ácido sulfámico al 0.5% y deje reposar otro medio minuto más, entonces adicione una gota de solución al 0.1% de diclorhidrato

de N-1-naftiletilendiamina. Si el nitrazepam esta presente un color magenta se forma lentamente.*

Las otras benzodiazepinas primero deben ser hidrolizadas*1 a 2-amino-5-clorobenzofenona para después llevar a cabo la reacción, muchos de los metabolitos de las benzodiazepinas rinden este producto al hidrolizarse por lo que estas pruebas requieren el uso de equipos y otros materiales, y ya no es posible aplicarlas en el lugar de recolección de las muestras.*

1 Hidrólisis de benzodiazepinas para Bratton -Marshall:* Caliente 4 ml de muestra con 1ml de ácido clorhídrico concentrado en un baño de ebullición por 15 min, enfríe y torne alcalina la solución con solución de hidróxido de sodio al 20%, adicione en igual volumen de cloroformo y 10g de sulfato de sodio anhidro. Agite fuertemente y decante el cloroformo en una pequeña vasija y evapore hasta sequedad, adicione los reactivos para realizar la reacción con desarrollo de color.

La prueba detecta directamente las benzodiazepinas pero no es específica, es necesario correr un blanco del material no hidrolizado con el fin de eliminar de la muestra otras sustancias que puedan dar respuesta positiva.*



El examen ultravioleta del contenido estomacal si es colectado dentro de las primeras 2 horas de la ingestión, nos puede indicar una sobredosis. El clordiazepóxido una vez hidrolizado se hace reaccionar con N-1-naftiletilendiamina y la reacción se lee a 550 nm. Este ensayo no permite diferenciar entre el fármaco y sus metabolitos y puede además ser interferido por aminas aromáticas primarias tales como sulfonamidas y procafnamida.²³

Desarrollo de la prueba UV: acidifique una alícuota de la muestra de contenido estomacal, con ácido clorhídrico 1N, extraiga con igual volumen de éter y reserve el extracto. Torne la muestra alcalina por adición de solución de amonía, y nuevamente extraiga con igual volumen de éter. Combine los dos extractos etéreos, y lave dos veces con agua destilada y entonces extraiga con 3 ml de ácido clorhídrico 1N. Realice un barrido de absorción ultravioleta del extracto ácido desde un rango de 220 hasta 360 nm (tabla 9) y compare la curva de absorción con curvas de soluciones estándar preparadas de las drogas.²⁴

Compuesto	Longitud de ondas del barrido en Ultravioleta (nm)
Clonazepam	275
Clorazepato	238,284
Clordiazepóxido	245-306
Diazepam	241,284 y 359
flurazepam	233,280
Medazepam	253
Nitrazepam	278y 340
Oxazepam	238 y 286

Tabla 9 Longitudes de onda del barrido en ultravioleta para diferentes benzodiazepinas.⁴

Existen en la bibliografía otros tres métodos, descritos a continuación, con desarrollo específico de color para el nitrazepam, incluyendo la muestra de polvos que provienen de las tabletas, sin embargo también pueden ser utilizados en otras muestras pero será necesario estandarizar los resultados obtenidos.¹⁴

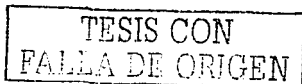
Procedimiento general 1 –método de calentamiento directo variante A-

Una pequeña cantidad de muestra es adicionada a un tubo de prueba flint glass/soda lime (Kimble #fs 73000-1075)², seguido por cinco gotas de DMF (dimetil formamida) o DMSO (dimetilsulfoxido); la muestra es entonces calentada a 100° C. Si las muestras contienen flunitrazepam produce un color púrpura intenso dentro de 4 minutos. Enfríe la muestra y adicione dos gotas de ácido clorhídrico concentrado, se produce de inmediato un color amarillo canario.¹⁴

Procedimiento general #1 variante B

Una pequeña cantidad de muestra es adicionada a un tubo de cualquier tipo, seguida de 5 a 10 gotas de DMF o DMSO y una pequeña cantidad de óxido de bario, hidróxido de bario o polvo fino de flint glass/soda lime (Kimble #fs 73000-1075), caliente la muestra a 100° C. Si las muestras contienen flunitrazepam se produce un visible color púrpura intenso en 4 minutos; enfríe la muestra y adicione 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado produciendo un rápido color amarillo canario.¹⁴

² Tubo de vidrio flint /fundadura de sodio marca kimble 73000-1075



Procedimiento general # 2 -Método de Base fuerte (cold)

Una pequeña cantidad de muestra es adiciona a un tubo de cualquier tipo, seguido de cinco a diez gotas de DMF o DMSO y una pequeña cantidad de hidróxido de sodio solido, si las muestras contienen flunitrazepam dan un color rojo púrpura (vino) de forma inmediata (el desarrollo de color debe ser inmediato para considerar la prueba positiva, y no en un lapso de tiempo como se desarrolla en las pruebas anteriores), adicione dos gotas de ácido clorhídrico concentrado y se formará un color amarillo canario.¹⁴

Las pruebas poseen una extraordinaria especificidad aún con estructuras relacionadas a las benzodicepinas que no dan la misma coloración (tabla 10), aunado al cambio de coloración drástico a amarillo, su sensibilidad permite tener un limite de detección $\leq 20 \mu\text{g}$ equivalente a 2 mg (concentración de Rohypnol).¹⁴

La desventaja que presenta esta prueba es que la presencia de agua en la muestra tiene un efecto pronunciado en la formación del color, requiriendo un período de calentamiento de hasta 15 minutos, si está presente el 20% o más de agua destilada el desarrollo de color se inhibe. La adición de agua a una prueba positiva provoca un cambio de color a naranja y llega a tornarse en amarillo brillante después de 24 horas.¹⁴

TABLA 10 RESULTADOS PRESUNTIVOS DE LAS PRUEBAS PRESENTADAS

Muestra Química	Color en prueba 1 (calentamiento a 100°C)	Color en prueba 2 Hidróxido de sodio
Alprazolam	N/C	Verde brillante
Clonazepam	N/C	amarillo
Clordiazepóxido	N/C	Amarillo brillante
Clorazepato	N/C	N/C
Diazepam	N/C	Naranja oscuro
Estazolam	N/C	Verde brillante
Flunitrazepam	Púrpura intenso	Rojo púrpura intenso (vino), amarillo canario cuando se acidifica con ácido clorhídrico. Idem
a. Mexicano	Púrpura intenso	idem
b. Brasileño	Púrpura intenso	idem
Lorazepam	N/C	Verde brillante
Midazolam	N/C	Amarillo-verde
Nitrazepam	Amarillo	amarillo
Osazolam	N/C	N/C
Osazepam	N/C	Amarillo-verde
Prazepam	N/C	Naranja-amarillo
Triazolam	N/C	Naranja oscuro
Temazepam	N/C	Verde brillante

N/C: no hay color. Tomado de F. Horowitz. Sci 1999:44

Algunas de las benzodiazepinas pueden ser detectadas por un rastreo general de drogas, utilizando la cromatografía de capa fina (TLC), si estas están presentes en concentraciones altas o tóxicas en el aspirado estomacal. El factor limitante para la detección de benzodiazepinas es la sensibilidad de los sprays convencionales usados durante el análisis.¹⁶

Para el análisis en *Cromatografía en capa fina*: la muestra se prepara al 1% en ácido acético 2N, el sistema de disolventes empleado es hidróxido de amonio-metanol (1.5:100) la localización se hace por medio de luz ultravioleta y por aspersión con el reactivo Drangedorff, presentando un Rf de 0.75 para el diazepam. ¹⁸

Desarrollo de la prueba TLC alternativa: Mezcle 5 ml de contenido estomacal y 0.1 ml de hidróxido de amonio en un tubo de ensayo con tapón de rosca y extraiga con dos porciones de cloruro de n-butilo por 3 minutos. Separe los extractos de cloruro de n-butilo del acuoso con una pipeta mezcle estos y centrifugue; torne la capa acuosa a pH 8.5 con un exceso de carbonato de sodio y extraiga por 5 minutos con 60 µl de una mezcla de isopropanol/cloroformo 1:1. ¹⁹

Extraiga los extractos orgánicos combinados por 3 minutos con 5 ml de ácido sulfúrico 0.2N en un tubo con tapón, remueva la capa de cloruro n-butilo con una pipeta desechable, evapore a sequedad bajo flujo de nitrógeno. Burbujeo aire o nitrógeno a través de los extractos de ácido sulfúrico por aproximadamente 1 minuto para remover el residuo de n-butilo. Este extracto puede evaluarse por una lámpara de luz ultravioleta antes de continuar. ¹⁹

Adicione 0.8 ml de hidróxido de amonio a 4.5 ml de extracto de ácido sulfúrico en un tubo de centrifuga, agite la solución por 2 minutos y centrifugue; el extracto clorofórmico contiene las drogas básicas. "

Desarrolle el cromatograma en una placa de silica gel G o GF de 250 μm y disolvente de elución de acetato de etilo/metanol/amonia (17:2:1) y observe en la siguiente secuencia: una vez obtenida la placa observe bajo la luz ultravioleta, rocfe la placa con 50 gm de fluram (fluorescamina) por litro de acetona y observe a luz ultravioleta el resultado es una fluorescencia amarilla, rocfe la placa con ninhidrina en acetona al 0.1%, caliente a 80°C por 5 minutos y observe bajo la luz ultravioleta, rocfe con iodoplatino potásico, se desarrolla un color oscuro que identifica las benzodiazepinas compare los Rf's obtenidos (tabla 11). "

TABLA 11 DE RESULTADOS DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Compuesto	Migración relativa R _f	Compuesto	Migración relativa R _f
Desalquilflurazepam	0.78	Desmetildiazepam	0.62
Desmetilclordiazepoxido	0.33	Diazepam	0.75
Flurazepam	0.72	Lorazepam	0.33
Halazepam	0.83	Medazepam	0.80
Alprazolam	0.53	Nitrazepam	0.67
Bromazepam	0.67	Oxazepam	0.56
Clobazolam	0.75	Prazepam	0.79
Clonazepam	0.62	Temazepam	0.67
Clordiazepoxido	0.56	Triazolam	0.52

Tomada del libro Methods in clinical chemistry, A.L. (Edce. J. A. Kaplan) Mosby Company Missouri, 1987



Una alternativa de TLC es una placa de silica gel 60F de 254 platos, se deja eluir hasta 40 minutos en el disolvente, se saca y se deja secar (leer con UV a 254 nm: hay absorción), rocíe con ninhidrina e irradie luz UV por 5 minutos con calentamiento a 70 °C, se observa la aparición de un color rosa que identifica las aminas presentes; secar y rociar spray de difenilcarbazona y seguido de sulfato de mercurio (la coloración azul-violeta identifica barbituratos y fenitoina), si se calienta a 70°C por 10 min. aparecen los metabolitos de fenotiazina y al observar con luz UV aparecen las benzodiazepinas y sus metabolitos presentando fluorescencia, rociar una vez más con iodoplatino y reactivo de Drangedorff, las manchas oscuras que aparecen identifican a benzodiazepinas, sin embargo esta ultima parte también se ve interferida con otras bases nitrogenadas."

Además se ha propuesto una serie de disolventes de elución para el desarrollo de la fluorescencia de las benzodiazepinas, las mezclas de acetato de etilo/metanol/hidróxido de amonio (85:10:5) en primera instancia se eluyen hasta 10 cm, se deja secar y se coloca en la siguiente mezcla de acetato de etilo/etanol (98:2), eluir otros 10 cm, secar y colocar en la nueva mezcla de disolventes de acetona/metanol (1:1), por ultimo observar con luz UV. "29"

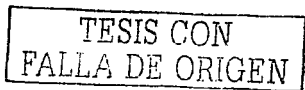
III ANÁLISIS QUÍMICO TOXICOLÓGICO DE LAS BENZODIACEPINAS

Para iniciar un proceso de análisis químico toxicológico, las primeras y fundamentales operaciones han de encaminarse a separar del medio de un problema o muestra las sustancias que posean interés toxicológico. Si esta separación no es correcta, si las posteriores purificaciones del extracto obtenido no son suficientes y si no se logra aislar entre sí a los diversos tóxicos que pudieran estar presentes simultáneamente, existirán muchas probabilidades de que el resultado final sea erróneo.³²⁴

De esta forma se deducen dos modalidades de análisis, según se posean o no pistas por lo que surgen una serie de fases que permitan el aislamiento y la determinación del tóxico. Primero: cuando no se sospecha de ningún tóxico en concreto y se requiere una sistemática analítica toxicológica general. Segundo: cuando se busca un determinado tóxico y puede hacerse una separación del medio o una técnica de identificación directa sin procesamiento de la muestra.¹⁴

1. Muestras sin historia.

Frecuentemente, el químico al que se le pide un análisis toxicológico se enfrenta con un vastísimo problema, cuya resolución, sino se le suministran algunas pistas, consumirá considerable esfuerzo, tiempo y dinero.⁵



Sin información que lo guíe, el analista debe eliminar los varios tipos de drogas y/o venenos paso por paso, al igual que en las formas sólidas de las drogas las pruebas pueden realizarse en especímenes biológicos, como la orina que es muy usada en estas pruebas sin algún proceso de extracción; lo mismo se puede realizar en contenido gástrico o emesis si no hay algún contaminante como comida pero el filtrado de estos puede servir muy bien para las pruebas.²⁴

El esquema de pruebas para un compuesto desconocido se puede basar en tres reactivos: el Mayer's, Wagners's y Dragendorff's; si el compuesto da una reacción de color con uno o más de estos otra alícuota es probada usando el reactivo de Marquis, y así sucesivamente como se muestra en el siguiente diagrama²⁴

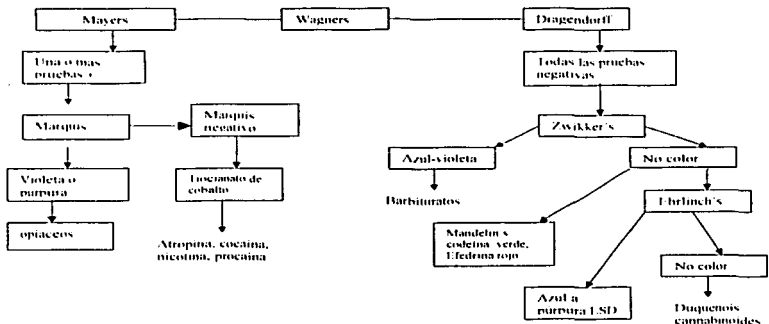


Fig. 8 Tomada de 24 y *J. Pharm. Sci.* 64, 842 (1975)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

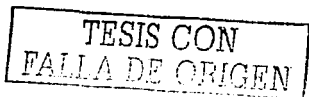
En general un screening (rastreo) debe ser llevado con una clara idea en la mente ya que existe una posibilidad gradual o la limitación de que más indicios sean obtenidos. El punto final de la técnica de rastreo es la identificación positiva de la droga o su metabolito característico, y si es posible una indicación (semicuantitativa) de significancia de la cantidad presente.²⁴

2. Muestras con historia.

Cuando se conoce el producto se buscan los procedimientos adecuados de separación y purificación por su naturaleza química, obteniéndose mejores rendimientos y manejo de muestras pequeñas. Las fases de análisis se dividen entonces en 4 pasos: separación o extracción del tóxico de la muestra problema; fraccionamiento del extracto, purificación del extracto y detección de la sustancia xenobiótica.²⁵

Al momento de establecer un método de extracción, deben tenerse en cuenta los siguientes factores:

1. Determinación analítica que se precisa: detectar dosis letales, tóxicas o terapéuticas; detectar sólo el tóxico sin transformar o también sus metabolitos.
2. Tipo de muestra: en cuanto a calidad y cantidad.
3. Posibilidades del laboratorio: tiempo, instrumental y personal.

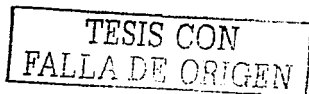


4. Naturaleza del tóxico: conocida o desconocida, uno sólo o mezcla compleja, un producto bien conocido analíticamente o un producto nuevo que necesite poner a punto un método adecuado para su extracción.^{14,23}

Normalmente la determinación cuantitativa exige recomenzar el análisis una vez identificado el tóxico, para aplicar los métodos de extracción y purificación más específicos para ese tóxico en particular, de forma que la recuperación del mismo sea máxima a consecuencia de una mayor separación, menor descomposición o pérdida, y finalmente aplicar la técnica de valoración más apropiada.²⁴

3. *Procesamiento de la muestra*

En la investigación toxicológica deben considerarse cuatro fases sucesivas: 1) extracción: la cual se lleva a cabo con disolventes orgánicos apolares o polares, y puede llevarse a cabo por métodos continuos o discontinuos; 2) purificación del extracto: depende de la muestra de que se haya partido para la extracción y puede realizarse por cromatografía o repetición de la extracción sobre el residuo de evaporación del primer extracto, 3) fraccionamiento de éste por grupos: por un lado se separan los tóxicos que hayan sido responsables de la intoxicación y por otro se orienta en cuanto a la identidad del tóxico por las características del grupo y 4) identificación: con las técnicas analíticas más adecuadas como espectrofotometría de ultravioleta, espectroscopia infrarrojo, cromatografía etc.^{14,21}



En la *extracción de contenido estomacal*: algunos fragmentos de cápsulas o tabletas y cualquier polvo pueden ser removidos y suspendidos en agua para la extracción; si la muestra contiene muchos residuos alimenticios o mucosidad, se pueden producir emulsiones estables durante el procedimiento de extracción y es necesario el siguiente pre-tratamiento: Adicione un exceso de sulfato de amonio sólido junto con unas gotas de ácido fosfórico, caliente, agite bien y filtre, el filtrado es extraído por el método descrito posteriormente.⁶²²

Existen en la bibliografía dos esquemas generales de extracción, (fig. 9), que pueden aplicarse a la extracción de benzodiazepinas contenidas en fluidos gástricos como los lavados, vómitos o contenido intestinal, previa purificación de la muestra por el gran contenido de proteínas o lípidos que interfieren o dificultan el análisis. En consecuencia es imprescindible aplicar un tratamiento dirigido fundamentalmente a eliminar las proteínas con diferentes agentes precipitantes como: sulfato de amonio (básicos), ácido tungstico (ácidos y neutros), ácido tricloroacético y ácido clorhídrico diluido (digestión ácida).²²¹

Esquema de Extracción de Drogas a partir de Contenido Estomacal Método 1

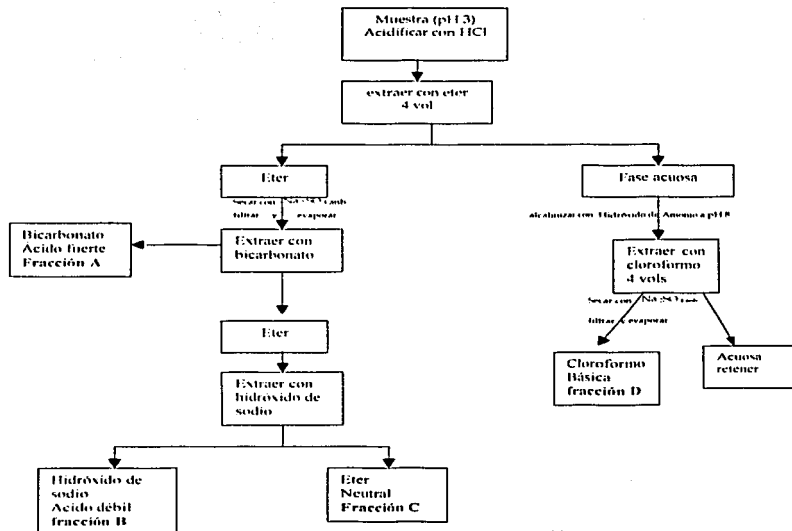


Fig 9 Procedimientos de extracción de drogas a partir de contenido estomacal. Ref 4,23,24

Esquema de Extracción de Drogas a partir de Contenido Estomacal, Método 2

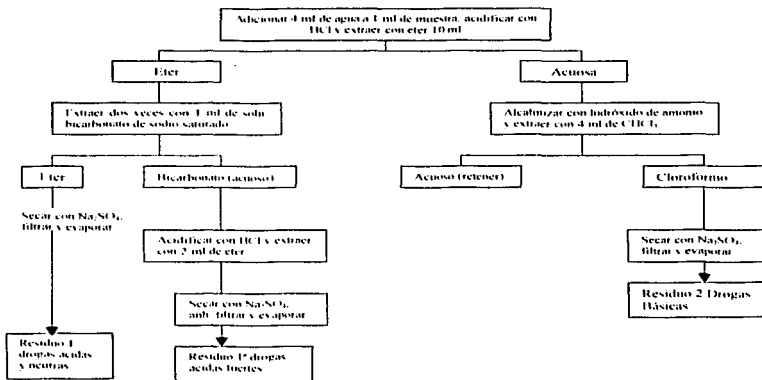


Fig. 9 Procedimientos de extracción de drogas a partir de contenido estomacal Ref 4,23,24

La fase acuosa en ambos esquemas puede ser usada para las siguientes pruebas, si el tamaño de muestra es inadecuado concentrar la fase acuosa en un baño de vapor antes de las pruebas para remover los disolventes y amoníaco, para no interferir en la sensibilidad del análisis.²²²

Tabla 12 Drogas comúnmente tomadas en sobre dosis las cuales pueden ser encontradas en varias fracciones obtenidas en los procesos de extracción

Fracción A Ácida	Fracción B Lig. ácida	Fracción C Neutra	Fracción D Básica
Ácidos orgánicos Ácido salicílico y salicilatos Barbituratos Tiazidas (diuréticos) Sulfonamidas Difemilhidantoina Metabolitos benzodicepinicos	Alcaloides Fenotizinas Salicilamida Fenitoína Barbituratos Fenilbutazona p-aminofenol	Cafeína Diazepam* Aminotriptilina Nitrazepam* Fenazona Fenacetin Paracetamol	Benzodicepinas Clordiacépoóxido Oxacepam diazepam Anfetamina Codeína Ergotamina Imipramina Morfina Quinina dextropropoxifeno

Tomada de 23 Handbook of analytical toxicology, Sundine y col 5

4. Análisis cualitativo

Los métodos analíticos rápidos para las benzodicepinas requieren sólo la medición de una droga o a lo mucho dos o tres compuestos adicionales. A veces debido al gran número de drogas y metabolitos en la clase de las benzodicepinas, el número de métodos reportados es ahora bastante largo e involucran muchos procedimientos, tales como HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución), espectrofluorescencia, espectrofotometría ultravioleta (UV), polarografía, cromatografía de capa fina y el procedimiento de inmunoenzayo EMIT entre otros.¹⁸

La cantidad de benzodiazepinas y sus metabolitos, sus características químicas, el amplio rango de concentraciones encontrado en análisis terapéuticos y toxicológicos, requieren que el laboratorio clínico use un método flexible que en su uso para el rastreo cualitativo sea tan bueno como para fines de cuantificación.^{16, 21}

Los métodos espectrofotométrico ultravioleta y fluorométrico tienen un uso limitado para el análisis de benzodiazepinas por que carecen de especificidad en discriminar entre varios compuestos análogos y sus metabolitos; en adición UV no es suficientemente sensible para el análisis de nuevas o más potentes drogas, por ejemplo algunas drogas que pueden extraerse en una fracción similar y exhiban una máxima absorbancia en longitud de onda (nm) en la misma región como diazepam o desmetildiazepam incluyendo metapirileno, flurazepam, desmetildiazepam, amitriptilina, lorazepam, prazepam e imipramina. Los métodos convencionales de UV para benzodiazepinas son limitados hasta los niveles de microgramos por mililitros por que los coeficientes de extinción son en orden de $10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.^{16, 20}

Usando el pulso diferencial polarográfico como una propuesta para el rastreo de la concentración total de benzodiazepinas en sangre, Brooks et al. ensayaron en sangre para el clordiazepóxido, diazepam, clordiazepóxido, exazepam, y sus metabolitos comunes antes de la cuantificación por métodos más específicos. Esta técnica es posible

porque la señal de salida en el pulso diferencial polarográfico es mucho más fuerte que la señal convencional directa de un polarógrafo. ¹⁶²⁰

El análisis de la benzodiacepina esta basado en la reducción del grupo 4,5-azometina. Los picos de potenciales de reducción (volts) para el clordiazepóxido, flurazepam y diazepam son -0.655, -0.635, y -0.715 respectivamente; el clordiazepóxido y el metabolito desmetil fueron caracterizados por el pico de reducción a -0.335V; el método fue adaptado para el análisis directo de orina diluida o contenido gástrico; su sensibilidad es de 0.25 a 0.5 µg/ml pero es limitado en especificidad. ¹⁶²⁰

Para largos programas de rastreo cualitativo de drogas en orina, aunque también se pueden aplicar a lavados gástricos filtrados, los procedimientos de TLC y ensayo homogéneo EMIT son los más usuales. El grado de sensibilidad del procedimiento de TLC es totalmente dependiente de la técnica de visualización por ejemplo, con algunas benzodiacepinas la fluorescencia se da con pequeñas cantidades de droga presentes (0.2 µg) y en otras ocasiones la reacción requiere concentraciones mayores. ¹⁶²¹

El procedimiento de EMIT (técnica de inmunoensayo de enzima multiplicada) es sensible hasta 0.5 µg/mL, y muy usado para grandes números de análisis de algunas clases de benzodiacepinas. Este tiene una ventaja diferente debido a su rapidez, y a que las muestras no requieren ser tratadas antes por algún método de extracción, a veces

EMIT esta limitado como método cuantitativo por que sólo da una medición total de los compuestos combinados análogos y sus metabolitos, y no hay reportes de uso para detectar las drogas más potentes alprazolam y triazolam; no se encontraron reportes de resultados falsos positivos pero si el 10% de inconclusos o resultados falsos negativos. 14

5. Análisis cuantitativo

La combinación de la técnica de TLC con la fluoro-densitometria para la cuantificación de benzodiazepinas y sus metabolitos es posible, pero no es eficiente para la rutina o el laboratorio debido a que el proceso de desarrollo del cromóforo requiere de 45 a 60 minutos. 14

Recientemente varios métodos de HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución) han sido sucesivamente usados para la cuantificación de clordiazepóxido y todos sus productos metabólicos. Estos métodos generalmente usan las columnas de fase reversa con detección de ultravioleta y la fase móvil consiste en disolventes orgánicos polares (metanol, acetonitrilo), mezclados con un buffer acuoso acidificado. 15

Esta reportado en la literatura un microprocedimiento rápido que usa un volumen de muestra (plasma) de 10 a 100 µl (Rutherford, 1977), la muestra es extraída directamente con n-acetato de butilo que contenía prazepam como estándar interno, después se inyecta en una columna OV-7 equipada con detector Ni ECD. la

inestabilidad del clordiazepóxido y sus dos primeros productos de metabolismo (desmetilclordiazepóxido y demoxepam) ponen al EC-GLC (cromatografía de gases-liquido con detector de captura de electrones), como una técnica analítica inapropiada, sin embargo el uso de la derivatización por metilación o silación es empleada para reducir la adsorción o los efectos de descomposición, pero también está el procedimiento usando ionización de flama en la misma columna después de una extracción con cloruro de n-butilo; este procedimiento esta limitado para casos de sobredosis en los que se involucran el diazepam, desmetildiazepam, flurazepam y desalquilflurazepam a concentraciones de 0.2 µg/ml o mayores.^{18,20}

Un método alternativo es reportado por Sunshine y Sutheimer para clordiazepóxido, desmetilclordiazepóxido, flurazepam, desalkilflurazepam, diazepam y desmetildiazepam, para un mililitro de muestra ya sea sangre, plasma, orina, hígado o contenido gástrico, en él es usado el clonazepam como estándar interno para la cuantificación, como disolvente de extracción se empleo cloruro de n-butilo, para disolvente de elución acetoniitrilo y buffer de fosfatos pH 3.3 separando en una columna Altex-rasphere-ODS (octadecilsulfato), el reporte de sensibilidad marca generalmente 0.01 µg/ml.¹⁸

La cromatografía de gases de ionización química-espectrofotometría de masas, es un método empleado en el trabajo de Negruz, A; Moore CM, et al, para la cuantificación

de benzodiazepinas en varios especímenes biológicos proveyendo especificidad y sensibilidad al análisis; en este el límite de cuantificación para 7-aminoflunitrazepam es de 10 pg/ml (después de la derivatización con HFBA (anhidrido-Heptafluorobutírico) y 100 pg/ml para flunitrazepam; las muestras fueron hidrolizadas con β -glucuronidasa y los analitos fueron extraídos usando columnas de fase sólida mixta Isolute HXC®.¹⁶¹⁷

Marc, LeBeau y compañeros desarrollaron un procedimiento de cromatografía líquida electropray-espectrofotometría de masas para el rastreo y confirmación de la presencia de flunitrazepam y sus metabolitos, que también permite cuantificar niveles bajos de estos en fluidos biológicos (incluyendo líquido gástrico); en él las muestras fueron tratadas con buffer de acetato de sodio 1.1 M, hidrolizadas con β -glucuronidasa y adicionadas con el estándar análogo deuterado, previo a la extracción con una fase sólida modificada eluida con acetato de etilo:hidróxido de amonio (98:2 %/%), y llevados a sequedad a 40°C para reconstituir el residuo con 20 μ l de fase móvil (metanol:agua:hidróxido de sodio 60:40:0.03 v/v/%) y una columna C 18, la sensibilidad de este procedimiento está en el orden de subnanogramos por mililitro.¹⁸

Laura Gorczynski y Melbye F, realizaron un estudio de detección de benzodiazepinas en diferentes tejidos de ratón (suero, hígado, cerebro, pulmón riñon y

hueso), utilizando la técnica cuantitativa ELISA³, las placas de ELISA fueron cubiertas con 50 µl de una dilución 1:200 de anticuerpos monoclonales antibenzodiazepínicos, además fueron bloqueados con 200 µl de suero fetal Calf (GIBCO,USA) y 10 µg/ml de antígeno a temperatura ambiente; se adiciono una dilución de anticuerpos antibenzodiazepínicos brillantes con muestras de contenido benzodiazepínico conocido (para construir una curva), como inhibidor para el enlace de la placa-benzodiazepina, las placas fueron desarrolladas usando una fosfatasa alcalina enlazada a anticuerpos antibrillantes y el sustrato p-nitrofenil fosfato, las lecturas de medición de la placa de ELISA se realizan a 405 nm.¹²

El ensayo usado esta limitado por la especificidad y la sensibilidad de los anticuerpos utilizados para la detección de las benzodiazepinas, pero la sensibilidad se puede incrementar por la manipulación de la concentración de los enlaces de midazolam en la placa ELISA y la adición de antibenzodiazepina brillante como un detector de anticuerpos para amplificar la señal.¹²

A continuación se presenta una tabla en la que se muestran algunos métodos empleados en el análisis tanto cualitativo como cuantitativo de las benzodiazepinas, así como algunas características de los mismos.

³ ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, se basa en la conjugación de la enzima fijada a un anticuerpo dirigido a un antígeno específico y su posterior cuantificación por adición de sustratos específicos con reacciones de cambio de color y la utilización de una curva de calibración

Tabla 13 METODOS DE ANÁLISIS DE BENZODIACEPINAS

Método	Tipo de Análisis	Principio	Uso	Comentarios
1. Cromatografía Gas-liquido GLC	Separación cromatográfica cuantitativa	Extracción de sangre alcalinizada, formación de benzotetona por hidrólisis ácida y análisis por GLC con detector de captura de electrones.	Determinación de drogas simples	No específico, pero puede ser corroborativo si se usan otros métodos.
	a. formación derivativa, detección de captura de electrones	Extracción de muestra alcalinizada, evaporación, reconstitución y análisis GLC	Screening y en	Limitada sensibilidad 0.2 µg/ml.
	b. Directo GLC detector de ionización de llama	Extracción de muestra alcalinizada, evaporación, reconstitución y análisis GLC	Método cuantificación	Más flexible para screening y cuantificación, sensibilidad de 0.01 a 0.5 µg/ml
	c. directo GLC detector de captura de electrones	Extracción de muestra alcalinizada, evaporación, reconstitución y análisis GLC	En uso común para cuantificación general	Particularmente usado en análisis de clordiazepóxido, sensibilidad aproximadamente 0.01 µg/ml.
2. Cromatografía de líquidos de alta resolución	separación cromatográfica, cuantitativa	Extracción de muestra alcalinizada, evaporación, reconstitución, separación usualmente en columnas de fase reversa y detección a 254 nm	Determinación de muestras simples	Ambos tienen limitada especificidad, los métodos ultravioleta no son sensibles.
3. Espectrofotometría	Ultravioleta, fluorescencia, cuantitativa	Extractos de drogas separadas en sílica gel y detectadas fluorométricamente	Screening de drogas	Sensibilidad de 0.2 µg/ml, no usado para triab. p. estadístico
4. Cromatografía de capa fina	Cromatografía, separación, cualitativa	Extracción de sangre alcalinizada y DPP para identificación	Screening de drogas	Sensibilidad variable de 0.5 µg/ml, equivalente oxazepam
5. Polarografía	Polarografía pulso diferencial (DPP)	Ensayo de enlaces competivos, la droga única y la enzima fosfolato deshidrogenasa y un anticuerpo desconocido, reactividad cruzada del anticuerpo para reaccionar con muchas benzodiazepinas.	Screening de drogas, usualmente empleado en orina	
6. Inmunoensayo	Ensayo de inmunoenzima multiplicada			

Tomada del libro *Methods in clinical chemistry*, Amadeo P. Pesce / Lawrence A. Kaplan Mosby Company Missouri, 1987

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. Discusión

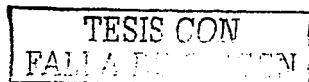
En la actualidad las benzodicepinas son encontradas frecuentemente en casos de intoxicación, en algunos de ellos es posible obtener muestras de contenido gástrico después de la ingestión, ya sea por el lavado, vomito e incluso si el paciente muere; estas muestras deben ser colectadas en frascos de vidrio de boca ancha que tengan tapa que ajuste perfectamente, y aunque no se han determinado la temperatura y tiempo adecuados para el envío de estas muestras es conocido que el mantener a bajas temperaturas las muestras biológicas retrasa su degradación y enviar al laboratorio lo más pronto posible; durante esta etapa se pueden realizar pruebas presuntivas como la prueba de Bratton Marshal, la adición del reactivo de Marquis o Dragendorff; McKibben en su artículo de rastreo por pruebas de color rápidas para flunitrazepam, describe 3 pruebas para identificar benzodicepinas por el desarrollo de color que también pueden aplicarse a las muestras recién colectadas, otras pruebas (UV, TLC GLC, etc.) que se aplican en la identificación preliminar tienen una ventaja y es que su costo es relativamente bajo, el tiempo de análisis se puede disminuir y en algunos casos como EMIT no es necesario el tratamiento de la muestra.

En general para la identificación, confirmación y cuantificación de las benzodicepinas, es necesario realizar tratamiento de extracción a las muestras para eliminar las posibles interferencias por contaminación o presencia de proteínas, dentro

de los métodos analíticos reportados para la cuantificación se encuentran la cromatografía, tanto de gases como de líquidos acopladas a sistemas de espectrofotometría de masas o de captura de electrones, estos métodos pueden aplicarse a diferentes fluidos biológicos y tejidos, dando buenas respuestas para la mayoría de los fármacos del grupo, y por ejemplo el clordiazepóxido que es térmicamente menos estable que los demás, es posible cuantificarlo utilizando la ionización de flama, e incluso Goreynski reporta el análisis cuantitativo utilizando la técnica de ELISA; todos estos métodos tienen en común la utilización de un estándar interno con características similares a las del tóxico que se está investigando, para que al momento de realizar los procesos de extracción se evalúe la capacidad del método para recuperarlo, y de esta forma aumentar la sensibilidad de las pruebas.

Los métodos aquí expuestos tienen en común el empleo de disolventes orgánicos para la extracción de la muestra, su posterior derivatización para poder ser evaluada por alguno de ellos, y la utilización de estándares internos.

Actualmente las pruebas preeliminarias que se usan como Bratton Marshall, presentan una desventaja y es que reaccionan de manera similar con aquellos fármacos que poseen una estructura o grupos funcionales similares dándonos resultados falsos positivos, por lo que podría proponer usar el método presentado por McKibben en su artículo (14), la prueba es rápida, simple, definitiva y no requiere de químicos, equipos o técnicas especializadas, a pesar de que en algún momento menciona el uso de tubos de



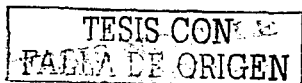
reacción, sin embargo estos pueden ser sustituidos por tubos normales y los reactivos son adquiridos en casas conocidas como Merck, Mallinkrodt y Aldrich.

En la cuantificación de las benzodiazepinas los métodos son más fáciles de escoger, todos ellos utilizan un estándar interno por lo que la comparación resulta mucho más fácil, aunado al avance de la tecnología los métodos de cromatografía cualquiera que sea la modalidad acoplada a un sistema de identificación como espectrofotometría de masas, sería la técnica de elección para la cuantificación de las benzodiazepinas en cualquier muestra previo tratamiento.

El estudio de las benzodiazepinas, no sólo en muestras de fluido gástrico, sino en diferentes tejidos e incluso líquidos ha cobrado importancia desde el momento en que se conoció que estas drogas eran utilizadas para asaltar sexualmente a las chicas, por los efectos de sedación potenciados al consumirlas con bebidas alcohólicas y que produce una pérdida temporal de la memoria o del conocimiento, así que actualmente los laboratorios encargados de la manufactura de la ya conocida tableta de Rohypnol (actualmente se conoce como la droga facilitadora de asaltos sexuales), se han dado a la tarea de adicionar un colorante que lo haga evidente en las bebidas.

IV. BIBLIOGRAFIA

1. Alan Riehens, Vincent Marks, *Therapeutic Drug Monitoring*; Livingstone Great Britain 1981 ;Longman Group.
2. Avendaño L., Ma. del Carmen, *Introducción a la Química Farmacéutica*; Edit Iberoamericana, McGraw Hill. España 1996
3. Cabrera Bonett Rafael et al, *Toxicología de los Psicofármacos*; Mosby Year Book España 1993 pag 17-31 cap 4 53-71
4. Calabuig, Gisbert, *Medicina legal y toxicología*.4ª. edic, Edit. Salvat España 1991
5. Clarke, E. *Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem*; The Pharmaceutical Press London.1969
6. Curry, Alan, *Poison Detection in Human Organs*. 3ª Edic. USA 1976 Charlie Thomas Publisher
7. Erick Noji, Gabur D.Kelen. *Manual of Toxicology Emergencies*. Year Book Medical Publisher Inc. USA 1989
8. Garriott, C. James. *Forensic Toxicology: General considerations in Modern Legal Medicine, Psychiatry and Forensic Science*. Currant M^cGarry, Petty T.A. Davids Company. Philadelphia 1980.
9. Gaulier JM, Marquet P, et al, Fatal intoxication following self-administration of a massive dose of buprenorphine. *J Forensic Sci* 2000;45(1):226-228
10. Gerald K McEvoy *Drug Information 2000 AHFS* (American Hospital Formulary Services). AHFS 2000
11. Goodman and Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Vol 1, 9ª edic, México 1996 McGraw Hill
12. Gorecynski LY, Melbye FJ. Detection of benzodicepines in different tissues, including bone, using a quantitative ELISA assay. *J. Forensic Sci* 2001; 46(4):916-918



13. LeBeau MA, Montgomery MA, Wagner JR, Miller ML. Analysis of biofluids for flunitrazepam and metabolites by electrospray liquid chromatography/mass spectrometry. *J Forensic Sci* 2000;45(5):1133-1141
14. McKibben T. Simple and rapid color screening test for flunitrazepam (Rohypnol). *J Forensic Sci* 1999;44(2):396-400
15. Muson Jame W, *Pharmaceutical Analysis Moderns Methods part B.*; Marcel Dekker Inc. New York 1984
16. Negrusz A, Moore CM, et al. Deposition of 7-aminoflunitrazepam and flunitrazepam in hair after a single dose of Rohypnol®. *J Forensic Sci* 2001; 46(5):1143-1151
17. Negrusz A, Moore CM, et al. Elimination of 7-Aminoflunitrazepam and Flunitrazepam in urine after a single dose of rohypnol®. *J Forensic Sci* 2000;45(5):1031-1040
18. Pesce J, Amadeo, Kaplan ,Lawurence, *Methods in Clinical Chemistry.* Mosby Company; Missouri 1987
19. Repetto Manuel, *Toxicología Fundamental*; Edit. Científico Médica; Barcelona 1981
20. Sadeé Gertruida Wofgang; *Drug Level Analytical Techniques, Metabolism an Pharmacocinetics.* J.W. and Sons Inc. USA 1980
21. Scott KS, Oliver JS. The use of vitreous humor as an alternative to whole blood for the analysis of benzodizepines. *J Forensic Sci* 2001;46(3):694-697
22. Sunshine ,Irving; *Recent Developments in therapeutic drug monitoring and clinical toxicology*, Cap. 50,51,69 .Marcell Dekker USA 1992
23. Sunshine, Irving, *Handbook of analytical Toxicology*; .Rubber Co USA 1969
24. Sunshine, Irving, *Methodology for Analytical Toxicology*; CRC Press 2ª edic. USA 1978.
25. Secretaria de Salud, Laboratorio Nacional de Salud Publica; *Manual de técnicas y procedimientos para identificación de Estupefacientes.* 1987

26. Tapia C R. *Las adicciones dimensión, impacto y perspectivas*. El Manual Moderno México 1994

27. <http://www.cica.es/~amefo/>

28. <http://www.urg.es/~ajerez/medfor.htm>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN