ASPECTOS DE *TOXICOLOGÍA ANALÍTICA Y FORENSE*: ESTADO DE LOS CONOCIMIENTOS AL INICIO DEL SIGLO XXI

PROF. LUIS ALBERTO FERRARI

I- INTRODUCCION :

El análisis toxicológico aplicado a la clínica, la pericia forense, el análisis de alimentos o destinado a la evaluación de un riesgo asociado a exposición humana frente a sustancias químicas, constituye hoy una parte relevante de la práctica profesional en tanto involucra el manejo de compuestos susceptibles de producir intoxicación.

A lo largo del tiempo, el análisis toxicológico ha ido evolucionando desde las primitivas estrategias de identificación ,orientadas por grupos de sustancias y valiéndose de metodologías sencillas, hasta las disponibles hoy por medio de instrumentales de alta complejidad.

Resulta imprescindible contar con una capacidad de respuesta apropiada frente a la demanda de análisis , de por si muy variados y técnicamente complejos.

Cada caso a estudiar debería cumplir con un alto criterio de calidad, considerando disponibilidad, confiabilidad, especificidad y sensibilidad del método elegido. La ¨toma de muestra¨ constituye el primer eslabón y el que condicionará al resto del proceso hasta llegar al resultado. Por tanto establecer pautas claras en esta etapa crítica no resulta ocioso.

Nuestro país carece hoy de una norma al respecto y los laboratorios aplican protocolos de diversas procedencias o bien siguiendo un criterio personal con arreglo a los principios de la Química Analítica.

Sin embargo el Ministerio de Salud de la Nación Argentina, publicó en el Boletín oficial, bajo el numero 30.002 del 10 de Octubre de 2.002. una Guía de toma de muestra, conservación y transporte para análisis toxicológico, inspirada en parte en el documento de la Comisión STA (Sistematic Toxicological Analysis Committee) del TIAFT (The International Association of Forensic Toxicologist). Quien escribe esta contribución fue miembro del Comité Asesor en la elaboración de esta guía. Actualmente se encuentra en etapa de Revisión en algunos aspectos jurídicos y técnicos. Aún así sienta un importante precedente en el país en relación a la necesidad de consensuar o elaborar una norma que estandarice

los procesos de toma, preservación y conservación de muestras susceptibles de ulterior análisis.
El propósito de este artículo es servir de guía u orientación al profesional que actúa en los distintas etapas del análisis toxicológico, conteniendo recomendaciones y protocolos racionales y sencillos, adaptados lo mejor posible a los medios disponibles en nuestro país.
En el presente se plantean distintos aspectos del análisis toxicológico, desde los estrictamente técnicos como criterios y protocolos sobre selección, preparación y conservación de las muestras , hasta los aspectos legales asociados a los análisis como cadena de custodia y confidencialidad de los resultados. Se han agregado también recomendaciones sobre la forma óptima de funcionamiento de un laboratorio que vaya a realizar este tipo actividad .

TOXICOLOGIA ANALÍTICA

Toxicología Analítica es la aplicación de los métodos y técnicas del análisis químico con el objeto de detectar, identificar y cuantificar la presencia de sustancias, que en determinadas circunstancias pueden originar, daños a los seres vivos. Cabe señalar que algunos autores hacen mucho hincapié en dar a esta especialidad o rama de la Toxicología una entidad independiente de la Química analítica (I. Ojanperä, 2001). Su nacimiento y desarrollo corre paralelo al de la Toxicología Forense a partir de los inicios del siglo XIX, cuando para aclarar los posibles orígenes homicidas de fallecimientos de miembros de familias reconocidas en Europa de se hizo necesario contar con pruebas periciales que demostraran la presencia de un veneno determinado. (v.g: el caso Lafargué, arsénico ; caso Bocarmé, envenenamiento con Nicotina, mencionado por Fabre y Truhaut)

Los primeros éxitos del análisis toxicológico consistieron en la puesta a punto de métodos para identificar la presencia de determinados tóxicos en muestras de cadáveres recientes o exhumados. Podemos citar el método de análisis de arsénico de Marsh (1836), la separación e identificación de arsénico y mercurio por Reinsh (1841), la detección de fósforo de Mitscherlich (1855), o la extracción e identificación de la nicotina por Stas (1850). Paralelamente y como necesidad de detectar la presencia de posibles sustancias extrañas, se hace necesario desarrollar métodos generales de separación y aislamiento de sustancias tóxicas de muestras de fluidos y tejidos, Fresenius (1845), von Babs (1847). Son Stas y Otto (1855) quienes proponen una sistemática para el aislamiento de alcaloides, la cual, con ligeras modificaciones, se ha extendido su aplicación al análisis de tóxicos orgánicos en general por más de 150 años. (Repetto, 1997; Doull y col. 1986). Exprésase que esta técnica fue utilizada por el Laboratorio de la Asesoría

pericial de Tribunales de la provincia de Buenos Aires, hasta 1992, donde se reemplazó por las técnicas de columnas con rellenos especiales (tipo Extrelut-Merck-) y de Extracción en fase sólida (S. P. E). Las técnicas de micro extracción en fase sólida (S. P. M. E) comenzaron a utilizarse , en nuestro laboratorio, en 1.999.

Los métodos analíticos primitivos empleaban reacciones cualitativas basadas en la generación de color, formación de precipitados o cristales coloreados y métodos separativos de sublimación, destilación o extracción líquido-líquido.

A partir de 1.950, empiezan a aplicarse técnicas fisicoquímicas al análisis toxicológico, que se inician con la utilización de espectrofotómetros en el rango de la radiación visible y ultravioleta; mas recientemente hace su entrada la espectrometría Infrarroja y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, técnica ésta de aplicación muy restringida en Toxicología , hasta este año 2.003.

Un gran avance en el análisis toxicológico se inicia con la utilización de las técnicas cromatográficas en papel, aproximadamente a partir de 1952 y en capa fina en la década de 1960. Pero la fecha clave es 1965 en la que empieza a desarrollarse la cromatografía en fase gaseosa y posteriormente la cromatografía líquida de alta resolución, que permiten mediante el uso de fases estacionarias y de gases o fases líquidas muy diversas y de detectores basados en las distintas propiedades o naturaleza de las sustancias a detectar, contar con una amplia gama de procedimientos analíticos aplicables a familias o grupos de tóxicos diferentes de naturaleza orgánica, que además de facilitar la identificación y acortar los tiempos de análisis permiten la cuantificación de la droga con una mayor exactitud (Pfleger y col. 1992).

A los interesados en profundizar el tema les recomiendo el artículo del Profesor holandés Robert Maes, “ Current choice analytical methods in Toxicology ” y New analytical technologies in Forensic Science –between novelty and reliability. por M.J.Bogusz.(2000)

Tradicionalmente se han usado diferentes tipos de microensayos químicos que de forma presuntiva y rápida dan información cualitativa sobre la presencia de tóxicos individuales, o de grupos y familias de medicamentos y drogas. Los resultados de estos ensayos y procedimientos, conocidos usualmente como "métodos de screening", deben ser confirmados por otras técnicas o procedimientos de mayor capacidad identificativa y que posteriormente permitan la correspondiente cuantificación. La evolución de estas técnicas ha llegado al actual auge de los inmunoensayos, que fundamentalmente están desarrollados

para muestras líquidas con bajas interferencias de la matriz, tales como orina, aguas, sueros, etc.

Respecto a los procedimientos de separación y aislamiento de tóxicos de las diferentes matrices, también se producen avances importantes desde la primera sistemática propuesta por Stas y Otto en 1855. La introducción de modificaciones en ésta última, mejoran los rendimientos en la separación de los analitos en distintas muestras, por extracciones líquido-líquido, utilizando disoluciones acuosas a pH diferentes o distintos disolventes orgánicos, o de mezclas de estos, cuyas tensiones iónicas o polaridades favorecen la especificidad y eficacia del proceso extractivo.

El uso de las técnicas analíticas de cromatografía de gases y líquida de alta resolución permiten utilizar micrométodos de extracción directa de pequeños volúmenes de líquidos a pH tamponados, también con pequeñas cantidades del disolvente extractor en tubos de ensayo cerrados, evitando el uso de ampollas de decantación, minimizando el tiempo de análisis, disminuyendo notablemente la cantidad de disolventes orgánicos y evitando en muchas ocasiones la necesidad de eliminar por evaporación el disolvente. Todas estas circunstancias han conseguido mejorar los límites de detección de los analitos, incrementar la exactitud y disminuir relevantemente los límites de determinación gracias a que puede añadirse a la matriz, exiguas cantidades de patrones internos indirectos o directos deuterados. (análogos deuterados)

Una importante mejora en el análisis de compuestos orgánicos ha sido la utilización de métodos de **extracción en fase sólida (SPE)**, que usan pequeñas columnas rellenas de gránulos de fases sólidas apolares, polares o de resinas iónicas. Más recientemente se han implantado resinas mixtas, constituidas por fases sólidas apolares y/o polares funcionalizadas con grupos intercambiadores iónicos ácidos o básicos. Puede afirmarse que prácticamente en la actualidad estos métodos de extracción en fase sólida han desplazado a los métodos anteriores debido a su rapidez, obtención de extractos de alta pureza , costo (este es elevado en la etapa de adquisición del sistema de cámara de vacío, pero es compensado en el tiempo con el ahorro de disolventes de pureza analítica; más aún si las muestras recibidas son cuantiosas) y mejora en los límites de detección , así como los porcentajes de recuperación o extracción de los analitos.

Otro notable avance ha sido la introducción de los denominados métodos de **microextracción en fase sólida (SPME)** que permiten la extracción de tóxicos volátiles de muestras gaseosas, líquidas o de vapores liberados por difusión a espacios cerrados o confinados (recipientes). El analito volátil se absorbe sobre fases estacionarias, idénticas a las utilizadas en cromatografía gaseosa, unidas

químicamente a fibras muy finas de sílice fundidas insertadas en la aguja de una jeringa. Posteriormente, tras inyección en un cromatógrafo de gases o de líquidos de alta resolución, se procede a la desorción del analito y correspondiente análisis cromatográfico, evitándose así la presencia de sustancias interferentes constitutivas de la matriz a analizar.

La evolución del análisis de compuestos inorgánicos puede abordarse contemplando de forma separada el análisis de los elementos y cationes metálicos y de los aniones.

Desde los ensayos iniciales por métodos coloreados o por reacciones de precipitación, se pasó a los métodos fotocolorimétricos y posteriormente a los procedimientos espectrofotométricos de emisión. Sin duda alguna la posterior introducción de la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, (AAS), utilizando diversos procedimientos para conseguir el paso del elemento metálico desde la matriz analítica a su estado fundamental ha supuesto uno de los avances analíticos más importante en general, y como no, en su aplicación al análisis toxicológico al conseguir disminuir varios órdenes de magnitud los límites de detección y cuantificación. Otro lado, las Ciencias Forenses han aprovechado los frutos de estos adelantos utilizando el método para la determinación de Antimonio, Plomo y Bario en el análisis de restos de deflagración de pólvoras con objeto de establecer presencia de restos de primer o iniciador y determinación de distancia de disparo. En éste último caso se manejan niveles de corte del orden de la ppb (parte por billón). El generador de hidruros acoplado al AAS y el uso de los hornos pirolíticos ha incrementado los niveles de detección en forma asombrosa. (Ferrari, L.A. et al. 1.996; 2.000)

Las muy recientes mejoras tecnológicas y electrónicas han hecho recuperar la importancia de la espectrometría de emisión, al conseguir mediante el uso de fuentes de alta energía el estado de plasma, dando lugar a las técnicas de espectrometría de emisión de plasma (ICP). Estas técnicas permiten efectuar con suma velocidad y exactitud análisis secuenciales de conjuntos de elementos, según las necesidades concretas de cada tipo de análisis.

El análisis de aniones experimentó un notable avance con la posibilidad de poder analizar aniones específicos, cianuros, sulfuros, fluoruros, etc., utilizando la potenciometría con electrodos, cuya membrana selecciona específicamente el anión a determinar. Al responder a la ley de Nernst el intervalo de concentraciones es mucho más amplio que el de las restantes técnicas analíticas, que cumplen la ley de Beer-Lambert, incrementando las posibilidades de cuantificación de la muestra original sin tener que efectuar diluciones.

La investigación simultánea de varios aniones en muestras líquidas se ha conseguido con notables mejoras tras la introducción de la cromatografía líquida iónica (IC), que usando columnas apropiadas permite no sólo identificar y cuantificar aniones, sino también cationes. Esta última posibilidad está facilitando la especiación tanto de aniones como de cationes metálicos.

Es conveniente también resaltar las notables posibilidades y mejoras analíticas que se abren con la introducción de la electroforesis capilar (EC) en sus muy distintas modalidades y las posibilidades de usar muy diferentes detectores e incluso de acoplamiento a espectrómetros de masa.

Cabe mencionar los procedimientos de extracción de muestras sólidas por la técnica de extracción con fluidos supercríticos (SCF), las cuales ya han alcanzado uso muy extendido en el análisis bromatológico y de muestras ambientales.

A pesar de las grandes expectativas que se pusieron sobre esta metodología encuentra hoy una limitada aplicación en Toxicología Forense y disciplinas relacionadas. Ha sido aplicada para el aislamiento de algunos tipos de drogas en suero, tal como benzodiacepinas y agentes anabólicos. En general puede decirse que los resultados obtenidos con esta técnicas son similares a los obtenidos con la extracción en fase sólida (SPE), pero a un costo demasiado alto como para que se justifique su uso rutinario. (Staub, 1997 ; Allen & Oliver, 2000)

Hoy día la detección de xenobióticos en matrices biológicas es una tarea difícil, no solo por que se necesitan equipamientos que son relativamente caros, si no también porque aparecen entidades químicas diferentes con transformación parcial o total de las mismas en el organismo, lo que conlleva una buena preparación por parte de los químicos, así como el desarrollo de técnicas de laboratorio lo suficientemente sensibles y específicas, además de contar con los patrones de referencia de las drogas y sus posibles metabolitos.

Debido a esta amplia variedad de sustancias que pueden estar presentes en un determinado fluido o matriz, hace casi imposible diseñar un esquema único para aislamiento y determinación de las mismas.

Ahora bien, ¿qué lugar ocupan las drogas dentro de la Toxicología forense?

En Toxicología Forense los tóxicos se clasifican en seis grupos de acuerdo a los métodos que se utilizan para aislarlos de los fluidos biológicos u otro tipo de matrices.

En la tabla I se ilustran los diferentes grupos, el método común de aislamiento y ejemplos de cada uno de ellos.

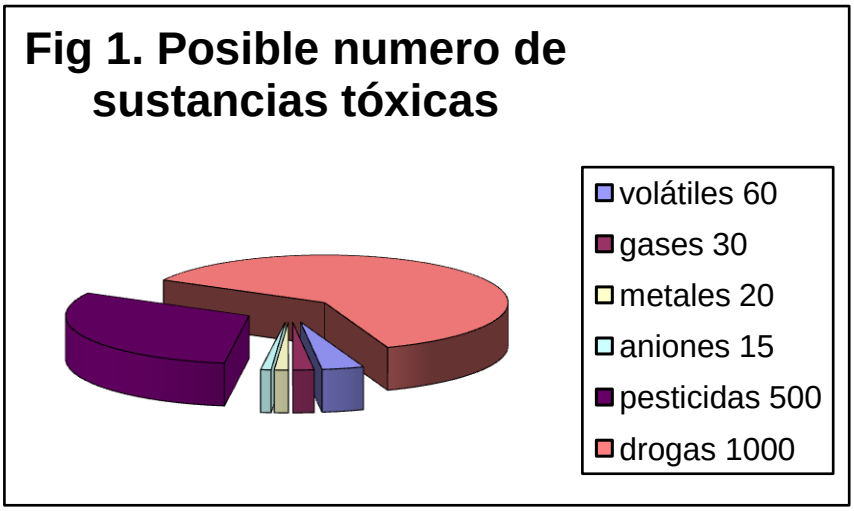
Como puede observarse en la fig 1 , el grupo mas numeroso son las drogas, con alrededor de 1000 compuestos diferentes lo que le da una importancia singular además de tener la mayor incidencia en casi todo el mundo, ya sea como drogas de abuso o como medicamentos de manera general.

Las drogas son todas aquellas sustancias naturales o sintéticas que introducidas en el organismo modifican, alteran, o reparan una de las funciones normales del organismo vivo.

En esta contribución se ha dividido las drogas en Psicofármacos y drogas bioactivas. Los Psicofármacos son todas aquellas drogas que tienen actividad sobre el sistema nervioso central y las drogas bioactivas (no Psicofármacos) son todas las restantes.

Tabla I. Clasificación de los tóxicos por grupo y método de aislamiento

GRUPO	MÉTODO DE AISLAMIENTO	EJEMPLO
Aniones	diálisis	Clorato,fluoruro,hipoclorito,persulfito ,nitrato,etc
metales	Destrucción de la materia orgánica o digestión por microondas	As, Sb, Pb, Li, Hg, Tl, etc.
gases	Destilación fraccionada Microdifusión Espacio-cabeza / GC SPME- GC	Monóxido de carbono, ácido cianhídrico, gases anestésicos, etc
Tóxicos volátiles	Destilación Fraccionada Espacio-cabeza/ GC Microdifusión SPME- GC	Etanol, metanol , aldehidos , ácido fórmico, tolueno, acetona , naftas ,etc
pesticidas	Extracción liq-liq Método AOAC (DMSO-Florisil) SPME-GC	órganofosforados , órganoclorados , carbamatos, piretroides
drogas	Extracción liq-liq SPE; Extrelut; SPME	Psicofármacos y no Psicofármacos



La organización mundial de la salud (OMS) ha clasificado los Psicofármacos en tres grandes grupos:

- **PSICOLEPTICOS O PSICODEPRESORES**
- **PSICOANALEPTICOS O ESTIMULANTES**
- **PSICODISLEPTICOS O PERTURBADORES**

En la tabla III aparece en forma abreviada y tratando de mostrar los ejemplos mas importantes, la clasificación de Psicofármacos según la OMS.

En la tabla II presentamos algunos de los no Psicofármacos (drogas bioactivas) como ejemplos significativos de los mismos.

Tabla II. Ejemplos de no Psicofármacos.

CLASIFICACION	EJEMPLOS
β--bloqueantes adrenoreceptores	Propanolol, sotalol, timolol, practolol
antiarrítmicos	Tocainida, meclozine.
anticolinérgicos	Tigloidina, metilsulfato de polidina.
diuréticos	Metolazone,furosemida,hidroclorotiazida.
antibióticos	Penicilinas, tetracilinas, etc
antidiabéticos	Glibornurida. Clorpropamida, etc
Glicósidos cardiactivos	Digoxina, digitoxina, etc

Tabla III. Clasificación de Psicofármacos según la OMS.

1. PSICOLEPTICOS:

A) Hipnóticos:

- **Barbitúricos:**
  Fenobarbital, Amobarbital, secobarbital, etc

- **No barbitúricos:**
  Hidrato de cloral, glutetimida, benzodiacepinas, etc.

B) Tranquilizantes menores (ansioliticos):

- **Derivados de la benacticina:**
  Benacticina

- **Carbamatos:**
  Meprobamato, carisoprodol, etc.

- **Benzodiacepinas:**
  Diazepam, nitrazepam, medazepam, clonazepan, etc.

C)Tranquilizantes mayores (neurolépticos)

- **Fenotiacinas:**
  Clorpromacina, trifluoperacina, otros

- **Butirofenonas:**
  Haloperidol, otros

- **Reserpinoides:**
  Reserpina,

2. <u>PSICOANALEPTICOS</u> (estimulantes psíquicos):

A)Tipo IMAO

B)Tipo no IMAO:

- **Antidepresivos tricíclicos**:
  Imipramina, desipramina, amitriptilina, otros

C) Cocaína y derivados:
Cocaína, novocaína, procaína

D) Tipo anfetaminas:

- **Anfetaminas y derivados:**
  Metanfetamina, metilendioximetanfetamina, efedrina, pseudoefedrina, otros

3. <u>PSICODISLEPTICOS</u>:
A) Alucinógenos:

- **Indolalquilaminas:**
  LSD

- **Fenilalquilaminas:**
  Mescalina

- **Preparados de la cannabis:**
  Marihuana**,** hashis, aceite de Cannabis

B)Tipo atropinico: Atropina, otros

C)Tipo opiáceos:
- **Opiáceos y opioides :** morfina, codeína, heroína, etc.

Todos los compuestos extraños o xenobióticos pueden ser determinados en matrices biológicas y no biológicas ; de manera directa e indirecta.
Por lo tanto tenemos cuatro modalidades de análisis en Toxicología forense que podemos resumir de la manera siguiente:

Consideraciones generales

1. **<u>análisis orientado en fluidos biológicos:</u>**

Esta modalidad implica la aplicación de procedimientos de extracción y determinación especificas para una determinada sustancia que se quiere buscar y se lleva a cabo cuando los antecedentes del caso apuntan hacia la misma o si se quieren hacer determinaciones cuantitativas.

2. **<u>análisis de drogas desconocidas en fluidos biológicos:</u>**

Esta modalidad implica la aplicación de un "**screening**" para descartar el mayor numero de tóxicos posibles e incluir un numero reducido de ellos, hasta lograr la identificación, pudiendo posteriormente aplicar una técnica directa para aumentar la eficiencia de los análisis.
Este procedimiento de screening puede variar algo dependiendo de la muestra biológica que se trate.

3. **<u>análisis orientado en muestras no biológicas:</u>**

Como en el primer caso la determinación se lleva a cabo mediante una técnica ya probada y utilizando como patrones de referencia las sustancia sospechosa, debido a que los antecedentes del caso así lo requieren.

4. Análisis sin orientación en muestras no biológicas:

Como las muestras pueden ser tan diferentes, existen varios procedimientos de screening dependiendo del estado físico de la sustancia, solubilidad y de la naturaleza químico -física de la muestra en cuestión.

Independiente de la modalidad de los análisis, generalmente tendremos cinco pasos fundamentales, cuya comprensión es de extrema importancia para obtener buenos resultados, y cada uno de ellos representa prácticamente un campo dentro de la toxicología analítica:

1. Preparación de la muestra:

Este paso es crucial en los análisis. Generalmente involucra la homogeneización de las muestras, ajustes de pH, pesaje, procedimientos de hidrólisis (ácida, básica o enzimática), precipitación, centrifugación, etc.
Debido a la complejidad de las muestras biológicas esta etapa es relevante. Así, si no es bien desmenuzado el tejido separado para el estudio, el rendimiento en la etapa posterior de extracción será bajo ; el peso debe ser exacto para realizar futuras cuantificaciones de analito y referirlo a la alícuota de tejido tomado.
En los casos de extracción directa con disolventes orgánicos, debe homogneizarse muy bien la papilla con un desecante como sulfato de sodio anhidro , llevando a consistencia tal que los gránulos se deslicen fácilmente, es decir, que el tenor de humedad sea tan bajo como sea posible.

2. Aislamiento del analito:

Como se pudo ver en la tabla I el método de aislamiento dependerá de la naturaleza del tóxico que se quiere aislar.
En el caso de las drogas la tendencia ha sido desde la extracción con cloruro de n-butilo, que fue uno de los primeros solventes declarados como extractores selectivos de drogas, después las extracciones con sales y con solventes, o sea los métodos de “salting out”, hasta la de uso más extendido hoy : extracción en fase sólida (SPE), la cual presenta muchas ventajas con respecto a todas las anteriores como son mayor selectividad, ahorro de solventes y de tiempo, extractos mas limpios y mayor recuperación de los analitos, como fue expresado precedentemente.

Existen muchos trabajos que comparan la extracción Liq-Liq con la SPE, demostrándose cada ves mas sus ventajas, pero no obstante ello la extracción Liq-Liq se sigue usando, dependiendo de los recursos con que cuenta cada laboratorio.
También puede mencionarse el empleo de la microextracción en fase sólida (SPME) como método de aislamiento permitiendo aislar por esta técnica trazas de tóxicos y metabolitos, que no pueden ser extraídos por SPE.

3. Concentración del extracto:

El objetivo de este paso es colocar el analito en el menor volumen posible y de esta manera aumentar la sensibilidad de los análisis. En el caso de las drogas es importante conocer que la concentración de los extractos debe realizarse en condiciones controladas, aunque las condiciones ideales son concentrar a temperatura ambiente y en corriente de nitrógeno o de aire.

4. Identificación del analito:

En la identificación del analito existen diferentes niveles de complejidad dependiendo de las técnicas que se utilicen para la detección de las mismas.
Así tenemos un nivel primario que utiliza técnicas de separación e identificación como la cromatografía en capa delgada (TLC) y la espectrofotometría UV como identificativa, además de reacciones de coloración como reacciones de orientación (colour test) etc.
Un nivel secundario involucra técnicas tales como la cromatografía de gases y la liquida de alta resolución ya sea para screening como para la determinación orientada y un nivel terciario que utiliza la espectrometría de masas acoplada con una cromatografía separativa tal como la cromatografía de gases y la liquida de alta resolución. (GC-MS, HPLC-MS). Esta última técnica (LC-MS) está desplazando a la cromatografía gaseosa , especialmente a la GC-MS. La creación de bibliotecas para la postrer comparación y la superación de los problemas con la interfase han sido pasos tan importantes que los expertos estiman que LC-MS será la técnica que dominará la analítica toxicológica en la primer década del dos mil. El que escribe esta contribución, ha notado el incremento de trabajos presentados, utilizando este tipo de técnica, en congresos internacionales. Olaf Drummer , prestigioso toxicólogo australiano, nota que el mejoramiento en la detectabilidad y la especificidad fueron de la mano con el dramático desarrollo en la tecnología computacional. Hubiese sido imposible 20 años atrás aplicar la potencia computacional que se requiere hoy para el análisis de miles de compuestos y sus metabolitos. (Drummer O, 2.002)
Antes de la aplicación de la cromatografía de gases y de la GC-MS la derivatización de los grupos funcionales es esencial para la detección de drogas a niveles muy bajos.
La derivatización mejora la especificidad, la sensibilidad y la precisión de los análisis, además las llamadas colas (tayling) en los cromatogramas se eliminan

considerablemente con la aplicación de procedimientos de derivatización , mejora- ndo además, la separación de sustancias conteniendo grupos funcionales tales como –COOH, -NH, -NH_2, -OH.
Los procedimientos de derivatización mas utilizados son la silanización (con N,O-bistrimetilsililfluoroacetamida BSTFA), la acilación con anhídrido pentafloropropionico (PFPA) , alquilación / acilación, etc.

5. Cuantificación del analito:

Una vez identificado el analito la cuantificación del mismo se puede realizar por una técnica directa, bien ajustada y utilizando patrones de referencia puros para análisis.
La cromatográfica gaseosa o liquida acoplada a la espectrometría de masas son las técnicas de mayor uso en la actualidad.

III-Aspectos legales relacionados con la toma y conservación de muestras para analisis de drogas en fluidos biológicos

1. El personal que tome la muestra es responsable que se rotule, su conservación antes que llegue al laboratorio y su transporte, además de facilitar los documentos necesarios con todos los datos requeridos (solicitud del peritaje)
2. La toma de la muestra debe ser supervisada con el objetivo que no sea adulterada o sustituida lo que conlleva a la invalidación de la misma.
3. El grupo de expertos de Bruselas recomienda la orina como muestra idónea para el análisis de drogas de abuso, de manera que dicha muestra debe tomarse por duplicado en frascos de 50ml de capacidad, que deben llenarse sus dos terceras partes. deben evitarse los frascos plásticos siempre que sea posible debido a que las drogas pueden absorberse en la superficie de los frascos y se afecta considerablemente los recobrados.
4. Inmediatamente después de la colección debe medirse la temperatura (que debe estar entre 32 y 38°c dentro de los cuatro minutos de su colección) y el pH. Si se sospecha cualquier adulteración se debe notificar al laboratorio. La orina debe chequearse si tiene algún precipitado, su color, si tiene espuma, etc. Se recomienda también la determinación de creatinina (180+-80 mg/dl, normal; 10-30mg/dl “probablemente esta diluida”;10mg/dl “diluida”) y la determinación de la gravedad específica (1.007-1.035 “normal”)
5. Es importante mantener las muestras en frío y en un lugar oscuro en el periodo de tiempo entre su toma y el análisis de las mismas .
6. Cuando la muestra llega al laboratorio se debe revisar y chequear contra las solicitudes de peritaje para asegurarnos que los datos coincidan plenamente,

guardándose una de las muestras para reiteración de los análisis si fuese necesario, durante un tiempo prefijado.

7. Las solicitudes de peritaje deben contener:

- Organo que solicita el peritaje y antecedentes del caso.
- Nombre y apellido del implicado, edad y peso.
- Fecha, hora y tipo de muestra que se colecta.
- Tiempo aproximado del ultimo consumo.
- Sustancias consumidas en las ultimas horas o días.
- Patrón de consumo.
- Temperatura y pH de la muestra en el momento de su colección.

8. los casos se deben inscribir en un registro de entrada, dándole a la misma un numero consecutivo que será escrito en los frascos y en solicitud de peritaje por la persona que la reciba, anotando también la cantidad de muestra recibida, hora de recepción, etc.
9. Si los análisis no se comienzan en el momento de la recepción las muestras deben guardarse en congelación .
10. Es importante mantener una completa seguridad y confidencialidad en todo momento. Cualquier información relacionada con el caso debe considerarse secreta y colocarse en un lugar seguro.
11. Al concluir el caso debe realizarse un informe pericial dirigido al organismo de instrucción que lo solicito, el cual debe reflejar no solo los resultados de los análisis sino todos los procedimientos que se utilizaron para llegar a los mismos.
12. En el caso de cadáveres las muestras pueden ser muy variables pero la orina sigue siendo la muestra mas importante para la determinación de drogas de abuso.en la tabla IV aparece información adicional acerca del muestreo en casos de cadáveres.

Tabla IV muestreo en el caso de cadáveres

Muestra	cantidad	Droga a investigar
Estomago y su contenido	todo	Cualquier droga ingerida
Hígado, riñón y bazo Corazón y pulmones	50g 50g	Drogas en general Algunos psicotrópicos, gases y solventes.
bilis	Toda	opiáceos
orina	toda	Idónea para drogas de abuso
cerebro	100g, parte media y central	Solventes liposolubles, psicotrópicos y drogas
sangre	2 muestras de 5ml y 10ml	Una para Etanol, otra para

		drogas
pelos	1 - 2g	Drogas de abuso: incorp. mediata (alta tecnología)

13. Todas las muestras deben guardarse en congelación antes y después de terminados los análisis y las muestras de sangre para determinación de Etanol deben conservarse con fluoruro de sodio al 2%.

De manera general los análisis de drogas en fluidos biológicos por parte de los laboratorios forenses tiene esencialmente dos objetivos fundamentales:

- Diagnostico del consumo de una droga de abuso en el marco de un proceso judicial.
- Diagnostico clínico en toxicología clínica y en tratamientos de rehabilitación.

A continuación se transcribe una recomendación efectuada por el Laboratorio de la Asesoría Pericial de Tribunales de la Prov. De Buenos Aires sobre toma y conservación de muestra. Incluye otros estudios (anatomía patológica, inmunohematología, etc.)

- ***Toma y remisión de Muestras en el Análisis toxicológico clínico, laboral y forense.***

La adecuada selección , recolección, preservación y envío de especimenes biológicos y cualquier otra muestra con el propósito de un a investigación toxicológico es de fundamental importancia. El éxito de un estudio analítico y su interpretación depende en grado sumo de esta etapa. Esto no solo es advertido por Comisiones Internacionales, constituida por toxicólogos notables, sino también surge de la experiencia espigada en los últimos años que indica el cuidado que debe ponerse optimizar esta etapa.

Es cierto que no todo estudio analítico toxicológico debe terminar en ámbito forense. No obstante los acontecimientos extraordinarios acaecidos en las dos últimas décadas nos han enseñado a movernos con prudencia en este sentido. Es decir, la posibilidad que nuestros estudios terminen ingresando en un estrado judicial.

Cada laboratorio debe dar instrucciones precisas sobre el tipo de matriz y cantidad mínima necesaria (según la metodología que aplicará), asegurándose requerir una cantidad adicional para repetición del análisis, si este fuese solicitado.
No resulta ocioso insistir en este punto. Sigue advirtiéndose fallas graves en este estadio del análisis.

I.-Materiales biológicos que deben remitirse al laboratorio toxicológico clínico y/o Forense.

Tipo de muestras en caso de *individuos fallecidos*:-Sangre, orina, vísceras: pulmón, corazón, cerebro, tráquea, hígado, riñón, bazo, tejido adiposo (grasa), pelo (pericraneal, púbico, axilar), uñas, humor vítreo, bilis.

Tipo de muestras en *individuos vivos:* sangre o suero, orina ,vómito, pelos, uñas, saliva.

2.-Modo correcto de remitir el material para estudio

A:- <u>Vísceras</u>:

Deben colocarse en recipientes rigurosamente limpios, sin agregado de ningún tipo de sustancia con fines de preservación ú otro motivo.

Si pudiera disponerse de un recipiente para cada órgano sería ideal, pero se acepta en la práctica colocarlos de la siguiente manera:

Recipiente I:-Cerebro
II:-Hígado, riñón y bazo.
" III:-Pulmón y corazón.
" IV:-Estómago y su contenido.

Dichos recipientes pueden ser de vidrio incoloro aunque, si se dispone de frascos de vidrio

color caramelo, estos serían apropiados especialmente para sustancias fotosensibles .

El cierre debe ser perfecto.- Si no es posible, sellar con parafina.- Evitar tapas de papel ó cartón. Pueden utilizarse recipientes plásticos con tapas del mismo material que permiten cierre perfecto.

Las bolsas plásticas serían apropiadas si pueden cerrarse herméticamente por algún medio, por ejemplo calor. Actualmente hay disponible bolsas plásticas de distintos tamaños para envasar las muestras , con un tipo de cierre inviolable; es decir, si se pretende abrir los recipientes una vez cerrados, se destruye el material, pudiéndose detectar así maniobras dolosas de apertura.

Rotúlese correctamente, con iniciales o numeraciones internas del laboratorio que no den lugar a confusión, utilizando escritores con tinta firme.

Colocar finalmente en refrigerador a 4°C.(La temperatura ideal es –20ºC, donde la actividad enzimática en los sistemas biológicos se halla prácticamente paralizada. Estudios de degradación de analitos –Drummer, O & Anderson-muestran que a estas temperaturas los tejidos y humores biológicos sufren poca pérdida de los mismos por biotransformación.).

Embalar las muestras en recipientes apropiados (v.g: cajas de cartón resistentes).asegurando que los recipientes contenidos dentro de la caja no puedan sufrir roturas, durante el traslado al laboratorio.

Enviar **LO ANTES POSIBLE** al laboratorio, evitando interrumpir la cadena de frío, durante el traslado. Si deben recorrerse grandes

distancias, pueden utilizarse recipientes de tergopol con hielo en su interior.

B.- **Sangre:-**

Los recipientes que se envían pueden ser frascos, preferiblemente pequeños, con su respectiva tapa para lograr cierre hermético ó bien tubos de ensayo con cierre perfecto.- Puede agregarse fluoruro de sodio como preservador, aunque si es refrigerada y llevada rápidamente al laboratorio no es imprescindible.

En necesario como mínimo l0 ml. Para someter este fluido a estudio toxicológico general y 2 ml. Para estudio de alcoholemia (esto si se cuenta con Cromatógrafo Gaseoso ó se aplica la técnica de microdifusión).

Cuando se envasa sangre ó suero, **NO DEBE QUEDAR ESPACIO VACIO EN EL RECIPIENTE,** es decir se debe evitar **CÁMARA DE AIRE,** que produce pérdidas importantes no sólo de etanol sino cualquier otro tóxico volátil.-Para evitar esto, *llénese al* ras, tápese *bien y sí es posible séllese* con precinto de aluminio (como los viales de medicamentos inyectables) .

NO ENJUAGUE NUNCA CON ALCOHOL los recipientes que se propone utilizar para colocar sangre ó suero.- Tampoco utilice este solvente para desinfectar la piel del individuo al que se extrae muestra hemática.- Es recomendable no solicitar

frascos pequeños en Hospitales ó unidades sanitarias: Muchas veces quedan restos de medicamentos que no se extraen con lavado “casero”, provocando confusiones en el ulterior estudio analítico.-En los casos de extracciones a imputados de un ilícito, se recomienda la extracción de por lo menos DOS muestras sanguíneas consecutivas, con un intervalo de una hora entre ambas extracciones.- Anótese la hora y rotúlese claramente. (Importante para determinación de alcoholemias retrospectivas).-

C: **-<u>Orina</u>** : -

En forma similar a la recolección sanguínea, obviamente colocada en recipientes de mayor capacidad.

Enviar como mínimo 10 m1, pero es conveniente remitir toda la existente en vejiga en casos post-mortem o la emitida por individuo vivo, en 24 hs.-Rotular y cerrar perfectamente.-Colocar día, mes y hora de emisión ó recolección y fecha y hora de una dada circunstancia por la que se le pide la determinación.(v.g: determinación de cocaína o metabolitos) . **NO AGREGAR NINGUNA SUSTANCIA COMO CONSERVANTE.-** Refrigerar a 4°C.

D.-<u>Pelo:-</u>

Forma de recolección;- Cortar en SECTOR OCCIPITAL Y/0 PARIETAL.- Bien al ras del cuero cabelludo, en lo posible 1 ó 2 grs. (en la práctica un puñado o mechón es suficiente).-Tomar el extremo cercano al cuero cabelludo, colocarlo sobre el papel ó cartón y abrochar con aplique de broches tamaño

apropiado, colocar otro papel o cartón encima del anterior y pegar o atar según corresponda.-El envoltorio debe permanecer firme. Indíquese claramente la zona cercana al cuero cabelludo y la distal.

Tomar vello pubiano y axilar, cortado al ras de la piel y colocarlo en sobre de papel común.

3:-Información básica que debe consignarse:-

Para casos de análisis post-Mortem:

Informe de autopsia, minucioso indicando los míminos detalles de la observación macroscópica.- Si el médico autopsiante estima, aunque no este totalmente seguro, probable existencia de alguna sustancia tóxica, debe consignarlo o bien el analista requerirlo.

-Historia Clínica (especialmente casos mala praxis).-

-Drogas que se piensa o se sabe que consumía el individuo antes de morir.

-Profesión ó actividad laboral que desarrollaba.-

-Síntomas ó conducta que presentaba el individuo antes de fallecer.

Observación:

Remitir todo efecto que se piense pudo estar relacionado con el deceso de la víctima.

POLVORA EN PRENDAS:-

Instructivo para preparación, conservación y envio al laboratorio:

Tanto los residuos como las partículas de pólvora parcialmente quemadas se depositarán sobre un blanco en una disposición definida dependiendo de

la distancia que existe entre el blanco y la boca del cañón.

Cuando se trata de **DISPAROS DE CONTACTO** deberán examinarse todas las ropas que se hallan en el camino del proyectil.

CONDICIONES DE REMISIÓN DEL MATERIAL

Existen numerosos factores que afectan la retención de residuos sobre la prenda de modo que el valor de prueba queda condicionado al seguimiento estricto de los pasos detallados en el instructivo:

1:-a¡:-Retirar las prendas en forma lenta y por sectores de la víctima.- De no ser posible, se sugiere cortar las mismas por zonas que no comprometan orificios y/o desgarros que han de ser fundamentales para el análisis.

b) :-Si existieran manchas de sangre húmeda deben secarse al aire ó con corriente tibia de aire y flujo débil.

2:-Deben colocarse una por una, en forma separada, entre dos planchas de cartón perfectamente dispuestas, atadas con hilo, evitando roces ó corrimientos, principalmente en las zonas donde hay presunción de existencia de residuos de fulminante ó esquirlas de balsa.

LO IMPORTANTE ES ASEGURAR EL ÁREA A PERICIAR.-

ANEXO DOS

Sección Anatomía Patológica.

De acuerdo a las funciones comprendidas en el artículo 18 del Acuerdo 1793 correspondiente a la Sección Anatomía Patológica el material debe ser remitido de la siguiente manera:

A:- Para el estudio histológico de vísceras para la determinación de muerte intrauterina o post natal en caso de presunto infanticidio.

B:- Estudio microscópico del aparato genital femenino y de restos embrionarios fetales, para la determinación de signos histológicos de gestación y de lesiones traumáticas e infecciones en caso de presunto aborto.

C:- Estudio histológíco de piel, vísceras y tejidos blandos en los casos de ahorcadura y estrangulación.D:Estudio histológico de la naturaleza de heridas por armas cortantes, de fuego, explosivos y lesiones por el paso de corriente eléctrica.

E:- Estudio histológico de vísceras de muertes dudosas para la posible determinación de sus causas.-

Es necesario que el material orgánico remitido a estos laboratorios, en recipientes amplios de boca ancha, tapados ó en bolsas especialmente plásticas con un sistema de cierre inviolable en solución fíjadora (solución formol al 10 %).- La

cantidad de formol que se debe agregar tiene que ser 10 veces el volumen del material remitido.- En caso de no contar con formol, el material puede ser guardado en heladera.- **Nunca se debe guardar en heladera material que ya contiene formol,** debido a que el formol congelado forma cristales que rompen las estructuras hísticas, impidiendo el ulterior estudio microscópico.

Con respecto a líquidos corporales (pleurales, periciados, peritoneales), éstos deben ser remitidos en envases con tapa a rosca conservados en frío , agregarles el mismo volumen de alcohol 96°.

OBSERVACIONES:-

El material debe ser enviado en formol, ya que este detiene el proceso natural de putrefacción que impide ver al microscopio las estructuras histológicas.

El frío y el alcohol utilizado para la preservación de los líquidos corporales, tiene como finalidad la conservación de las estructuras citológicas.

Para estudio microscópico para la identificación de pelos, ya sea por arrancamiento ó los hallados en el lugar del hecho, prendas ú otros elementos se deben remitir en sobres de papel correctamente cerrados

ANEXO TRES QUIMICA AMBIENTAL, pertenece a QUIMICA LEGAL

Instructivo sobre la toma de muestras ambientales.

El presente instructivo se desarrolla con la finalidad de una correcta toma de muestras de tipo ambiental (aguas, barros, sedimentos y efluentes industriales), donde se excluyen las muestras de tipo aire dado la complejidad de las mismas en cuanto a equipamiento, instrumental y variedad de posibilidades.

Muestreo, preservación y almacenamiento.

E1 correcto resultado de una determinación no depende tan sólo del análisis propiamente dicho.

Esto se logra asegurándose una buena recolección de la muestra y una eficaz preservación hasta el momento de su análisis.

Ciertos parámetros conviene determinarlos in situ, por ejemplo:- Temperatura, gases disueltos, ph, cloro residual, turbidez y color.

Es muy importante que la muestra obtenida sea representativa del curso de agua a analizar.

En todos los casos , **aunque los frascos estén perfectamente limpios, deben ser enjuagados con la muestra 3 ó 4 veces.**

Es de suma importancia que al entregar una muestra al laboratorio, el frasco esté bien rotulado,

consignando en él la fecha y hora del muestreo, localización y el nombre del operador.- Es conveniente que la solicitud de análisis llegue al laboratorio acompañada de una planilla donde se encuentren los datos obtenidos en campo.-

exámen bacteriológico

La muestra mal extraída llevará a conclusiones erróneas en lo referente a la calidad del agua que pretende representar.

La muestra de agua será recogida siguiendo cuidadosamente las indicaciones que se detallan a continuación:

Para el caso de muestras obtenidas de agua de grifo debe elegirse aquel que esté comunicado directamente a la cañería de distribución, es decir, que el ramal en que se encuentre el grifo no debe estar conectado con tanques domiciliarios, filtros, ablandadores ú otros artefactos similares.

fECNICA

- Limpiar la boca del grifo.-
- Abrir el grifo totalmente y dejar fluir el agua durante 5 minutos.
- Cerrar el grifo.-
- Esterilizar el grifo calentando la boca del mismo durante 2 minutos con llama de una lámpara de alcohol ó con un hisopo de algodón embebido en alcohol.

- Abrir nuevamente el grifo y dejar fluir el agua durante 10 minutos.
- Destapar cuidadosamente el frasco evitando todo contacto de los dedos con la boca del mismo y con la tapa.
- Llenar el frasco, colocar la tapa inmediatamente. Rotular.- Remitir refrigerado a 4°c de inmediato al Laboratorio.

Para el caso de un grifo situado en la cañería de un pozo semisurgente, la técnica será:

**Abrir el grifo y dejar fluir el agua durante 30 minutos (si se trata de un pozo de uso continuo) o durante 5 horas (si se trata de un pozo que se utiliza poco ó si está fuera de servicio).

**A continuación proceder según la técnica detallada anteriormente.

Toma de muestras de aguas para examen físicoquimico.

Proceder a tomar la muestra en cantidad y envasarla de acuerdo a lo indicado por el perito.- Los recipientes no deben necesariamente estar esterilizados.- Rotular y remitir al laboratorio.

Toma de Muestra** de **barros ó sedimentos

En todos los casos deben tomarse los mismos en frascos de boca ancha, debidamente identificados con rótulos a tal fin.- Remitir al Laboratorio sin preservante de ningún tipo.- La cantidad a recoger será de unos 300 grs.- Tomar la muestra con espátulas ó dispositivo ad hoc.

Toma de muestra de efluentes industriales

Debe tomarse la muestra a la salida del establecimiento en cantidad acorde a los parámetros a medir y utilizar los envases según indicación del perito.- Enjuagar varias veces el recipiente con el líquido del efluente.- Remitir la muestra al Laboratorio rotulada.

.Laboratorio de inmunohematologia

Este laboratorio de inmunohematología, tiene a su cargo la identificación de

- 1:-Cadáveres y/o individuos.-
- 2:-Manchas de sangre.-
- 3:-Manchas de semen.

1):- Recolección de muestras para la identificación de cadáveres y/o índividuos.

La obtención de las muestras puede darse en distintas circunstancias:

a):- Una de las posibilidades puede ser mediante el procedimiento de autopsia (cadáveres) obteniendo una muestra sanguínea de aproximadamente 15ml por punción intracardíaca directa, utilizando aguja y jeringa descartables (estériles y secas).- Luego envasar la muestra en tubo cónico, con tapa a rosca, con sus respectivos rótulos y demás garantías de ley. Mantener refrigerado entre 4 y 6 grados centígrados **NO CONGELAR.**

En aquéllos casos en los cuales sobre la misma muestra se desea solicitar determinación de alcoholemia, el anticoagulante a emplear debe ser el fluoruro de sodio en una concentración de 15 mg/ml,

debiéndose observar la misma norma que para el caso anterior de conservarla en 4 y 6 grados centígrados.

Para el transporte, preservar dicha temperatura mediante el uso de bidones refrigerantes, evitando el contacto directo de los mismos con las muestras.

Manchas biológicas:

Un hecho fundamental en el análisis y resultados a alcanzar en el estudio de éstas lo constituye el proceso de obtención y su posterior conservación.- Tan es así que una inadecuada recolección y/o mala preservación puede alterar este tipo de evidencias, a tal punto que no sólo dificultarían sino que directamente imposibilitarían este tipo de pericias ya que los elementos a evaluar son en general sumamente lábiles.

2):-Manchas de sangre:-

Estas, en un principio, poseen un color rojo brillante que paulatinamente irá a una tonalidad pardo rojizo.- Para su levantamiento, un elemento a tener en cuenta será el tipo de superficie sobre la cual se encuentra asentada.

Así, si el soporte no es absorbente, luego de una minuciosa descripción de la distribución, posición y forma de las manchas (es de suma utilidad la obtención de fotografías), se puede proceder a poner en contacto la mancha con una gasa apenas húmeda en solución fisiológica, trasladándola

posteriormente a un tubo cónico con tapa a rosca (especialmente si la cantidad es escasa) ó eventualmente, a una cápsula de Petri, descartable, e inclusive a un sobre.- A continuación y en un lugar adecuado, se dejará secar la gasa, pudiendo usarse un secador de cabello con aire frío.- Luego el material será rotulado, lacrado e individualizado de modo tal que pueda identificarse claramente de donde fue obtenida cada una de las muestras y cumpla con las garantías de y debe conservarse a las temperaturas anteriormente expresadas.

Si la superficie es absorbente, por ejemplo una alfombra, cortinas, colchones, etc. Se evaluará la conveniencia de proceder a corta la mancha o bien, al envío del material en cuestión al laboratorio, siempre respetando, de ser necesario, las condiciones de secado previamente citadas.

Si las manchas están asentadas sobre prendas las mismas se dejarán secar en iguales condiciones a las ya expuestas, extendiéndola sobre bastidores ó superficies adecuadas, evitando el doblado, ya que podrían mancharse zonas que, en un principio, no lo estaban, alterando así la evidencia original.- Una vez seco, envolver por separado (prenda por prenda) en papel madera y proceder a continuación conforme a las garantías de ley.

Finalmente, cuando se trata de sangre no coagulada, se pueden seguir dos procedimientos :

El primero de ellos consiste en tomar con una pipeta Pastear ó bien con una jeringa, un volumen X de sangre (por ejemplo 3 mal) y colocarlos en un tubo de ensayo ó frasco conteniendo igual cantidad de solución fisiológica.- La segunda posibilidad sería colocar una tela de algodón ó papel de filtro,de modo tal que absorba dicho fluido, el cual sería secado a continuación según las condiciones ya descriptas.- En ésta operación el elemento absorbente será sostenido con pinzas adecuadas para tal fin. Finalizadas las operaciones enunciadas precedentemente, se procederá a rotular y lacrar el material obtenido.-También puede sugerirse la realización de extendidos sobre porta objetos de vidrio.-

3):-Manchas de semen.-

El elemento de importancia es el espermatozoide y su observación en forma completa es el elemento irrefutable de la presencia de esperma.

Dicha célula es muy lábil (frágil), siendo habitual que la cabeza se separe de la cola, imposibilitando el diagnóstico.

Es menester secar las prendas, ya que la humedad afecta los espermatozoídes.

Obtener hisopados y colocar los mismos en tubos de ensayo ó cónicos con tapa a rosca (limpios, secos y estériles).

Realizar extendidos sobre porta objetos de vidrio, dejar secar y luego envolver con papel, separando uno de otro y rotular para su posterior identificación, cumplimentando en todos los casos las garantías de ley

-Metodología para el análisis de drogas en fluidos biológicos sin orientación

SCREENING

Generalmente se recomienda seguir una estrategia que consiste en aplicar una técnica de screening inicial para descartar las muestras negativas y confirmar por otra técnica las muestras positivas.
Los screening de drogas de abuso en fluidos biológicos suelen realizarse en la mayoría de los laboratorios por una técnica de inmunoensayo o por cromatografía en capa delgada (TLC)
El screening en orina se realiza directamente en las muestras mediante técnicas de inmunoensayo o por reacciones de coloración y también luego de la extracción, mediante TLC.
Los **inmunoensayos** mas utilizados son el IEE (Inmuno Ensayo Enzimático), el RIE (Radio inmuno Ensayo), IEF(Inmuno Ensayo Fluorescente), y el IEA (Inmunoensayo por Aglutinación).
Los tres primeros necesitan instrumentos que son relativamente caros. Estas técnicas pueden ser utilizadas dependiendo de la disponibilidad con que cuente cada laboratorio y además de la cantidad de muestras a analizar, puesto que estos "KIT" tienen fecha de vencimiento y por ende deben adaptarse a la cantidad de trabajo.
Además existen ensayos simples o sea para una sola muestra y ensayos en serie para realizar un conjunto de ensayos consecutivos; lógicamente los precios varían de acuerdo al tipo de inmunoensayo : simple o en serie.
En los inmunoensayos es muy importante seguir las instrucciones del fabricante en cuanto a los cuidados que hay que tener y en general para llevar a cabo todos los procedimientos. Tienen la ventaja de una alta sensibilidad y pueden ser aplidirectamente a muestras de orina y plasma sin previa purificación . Sin embargo la baja especificidad es el mayor problema (muchas reacciones cruzadas)
La marcación puede ser radioisotópica, una enzima sustrato o un fluoróforo.
El sistema de detección puede medir radioactividad, absorvancia U.V, fluorescencia, fluorescencia polarizada, etc.

Las **reacciones de coloración** directamente en la orina tienen un uso limitado, solo algunas drogas pueden ser ensayadas por ejemplo: salicilatos, hidrocarburos halogenados, paracetamol, etc. En la tabla V aparecen algunas de las reacciones
de coloración que son útiles en el laboratorio.

MUESTRA	REACTIVO	RESPUESTA
2 gotas de orina	Cloruro férrico 5% (2 gotas)	Violeta:posibles salicilatos
0,5 ml de orina	Fujiwara(*)	Rojo-Violeta:posibles hidrocarburos Halogenados
0.1ml de orina hidrolizada	1ml de o-cresol a.1%(2ml) NH_3 2M	Azul:posible paracetamol.

(*) 0.5ml de orina + 0.5ml de KOH + 0.5ml de piridina. Se calienta a 100°c por 2 minutos.

En el screening por TLC y HPTLC se utilizan placas de silicagel 60 F-254nm (con indicador de fluorescencia), y lo que varía son las fases móviles y los sistemas de revelado.
En la tabla V está resumida las condiciones cromatográficas para llevar a cabo un rastreo preliminar por esta técnica.
Estos procedimientos se llevan a cabo siempre después de la hidrólisis si hiciera falta y por supuesto luego de las extracciones, las que pueden ser en fase sólida si esta disponible o extracciones liq-liq. Luego del aislamiento se le debe agregar HCl al 1% en etanol al extracto resultante para evitar las perdidas de drogas básicas volátiles en el momento de la concentración del extracto.
Una vez evaporados los extractos se reconstituyen en 100µl de metanol los que se van a distribuir en los diferentes sistemas descritos en la tabla VI .
Ahora debido a que la mayoría de las drogas se excretan conjugadas en la orina es necesario realizar la hidrólisis para romper los enlaces entre el ácido glucurónico y las diferentes especies que se forman.
Estos procedimientos de hidrólisis serán abordados cuando se describan las técnicas de determinación directa en el caso que lo requiera.

Tala VI. Screening por cromatografía en capa delgada

sistema	estándares	Fase móvil	reveladores
A	Pentobarbital Fenobarbital amobarbital	Cloroformo:acetona 90 : 10	1. Acetato de cobalto en metanol 0.5% 2. $HgSO_4$(5g deHgO + 20ml de H_2SO_4)
B	Meprobamato indometacina	Acetato de etilo Metanol NH_3:H_2O 43:5:0.5:1.5	1ml de furfuraldehido en 20ml de acetona
C	Codeína propoxifeno	Acetato de etilo Metanol NH_3:H_2O 43:5:0.5:1.5	Dragendorff Iodoplatinato

D	Amitriptilina fluoperacina	Acetato de etilo Metanol NH_3:H_2O 43:5:0.5:1.5	H_2SO_4-$FeCl_3$: 2ml $FeCl_3$ 5% + 40ml de agua + 60 ml de H_2SO_4
E	Anfetamina Efedrina MDMA	Metanol:NH_3 100:1.5	1. Sal fast black K1% en H_2O(fresco) 2. Vapores de NH_3 3. 2-4 Di nitro fluorbenceno
Be	Benzodiacepinas y derivados de la hidrólisis	Cloroformo:acetona 40:10	1. Rociado con HCl 10% 2. Observacion UV 366nm (fluorescencia)
THC	TCH-COOH	Benceno (75) n-Hexano(30) dietilamina(5)	1.Fast blue B 2. reactivo de duquenois
OP	Morfina Codeína Heroína	Tolueno Acetona Metanol:NH_3 22:22:4:2	1. Luz UV 254nm 2. Dragendorff 3. Iodoplatinato
Co	Cocaína Metabolitos Y cortes.	Metanol:NH_3 50:0.5	1.Dragendorff 2.Iodoplatinato

En la interpretación de los cromatogramas debemos tener en cuenta no solo el Rf relativo de la muestra que se esta investigando sino también la forma y el color de las máculas así como el comportamiento post revelación.
El límite de detección para la cromatografía en capa delgada en general, tiene un valor entre 1 y 5μg.
Todas las placas deben exponerse al UV antes de atomizarse con los respectivos reveladores y anotar cualquier dato considerado importante.

El sistema A es selectivo para barbitúricos los que dan máculas blancas las cuales pueden ser fugaces en la mayoría de los casos, por lo tanto se

recomienda anotar los resultados inmediatamente después de asperjada la placa.

El sistema B es bastante selectivo para carbamatos, pero debemos tener en cuenta que todas la fenotiacinas dan coloración con furfuraldehido.

La combinación de Dragendorff-Iodoplatinato que se utiliza en el sistema C no tiene selectividad, debido a que son muchas las drogas que responden al mismo, sin embargo hay muchas otras que no responden, como por ejemplo los barbitúricos, meprobamato y anfetaminas entre otros.

El sistema D es selectivo para fenotiacinas y antidepresivos.

El sistema E que usa Fast Black K no es selectivo, pero ha mostrado ser util para la deteccion de anfetaminas y compuestos relacionados, como también para drogas Bloqueadoras β-adrenérgicas.
Los colores producidos con este reactivo son estables y se tornan mas intensos a medida que pasa el tiempo. Las aminas primarias (como las aminas de putrefacción cadaverina y putrecina) dan color violeta y las secundarias anaranjado.

Muchas drogas que responden en el sistema C tienen metabolitos que responden en el sistema E de manera que se hace mas fácil la identificación (clorciclicina, propoxifeno, etc)

El sistema Be es muy selectivo para benzofenonas, lo que significa que lo es también para las benzodiacepinas las cuales se convierten en sus respectivas benzofenonas por hidrólisis ácida.

El sistema THC es selectivo para cannabinoles.

El sistema Op se usa para la detección de opiáceos fundamentalmente Morfina.

Métodos para la extracción de tóxicos orgánicos fijos

A comienzos del siglo pasado poco menos de 50 drogas podían ser clasificadas como tóxicos orgánicos fijos, pero con la explosión farmacéutica después de la segunda guerra mundial, esto ha quedado solo como recuerdo.

Para el aislamiento se cuentan con distintos métodos. Unos tienen por objeto obtener un extracto acuoso libre de proteínas(EALP). Los métodos ortodoxos

en este sentido son **: Stas-Otto-Kohn Abrest**, basado en la precipitación con alcohol etílico de las proteínas constituyente del tejido, previo tratamiento con ácido tartárico. El licor extraído por filtración es evaporado a presión reducida, utilizando un pequeño motor de medio HP, para evitar la descomposición de drogas termolábiles . El extracto siruposo obtenido y en caliente , es tratado nuevamente con alcohol etílico y dejado durante 24 horas, volviendo a repetirse el proceso en tres ciclos. Finalmente se retoma el residuo con solución acuosa sulfúrica o tartárica al 5%. Se obtiene un EALP, apto para su fraccionamiento con disolventes orgánicos. Ventajas: Se pueden trabajar mejor las muestras en avanzado estado de putrefacción (por ejemplo vísceras procedentes de exhumaciones) y es relativamente sencillo. Desventajas: bajo rendimiento por formación de flóculos en las varias etapas de precipitación que tiene el método. A. Curry en su *Poison detection in human organs* consigna algunos porcentajes de recuperación para diversas drogas, pero siempre son pequeños. Además el extracto es bastante impuro y requiere ulteriores etapas de purificación.

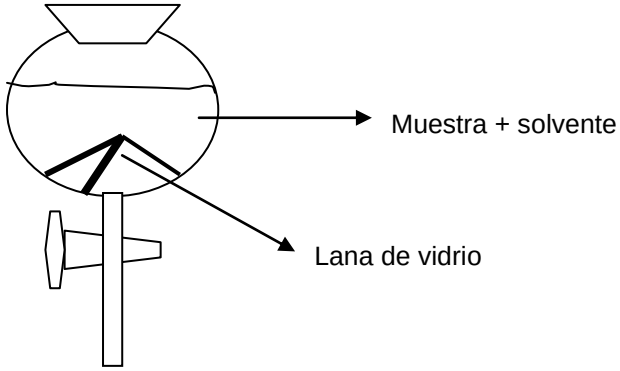
El método de Alan Curry, consiste en tratar la papilla finamente dividida con solución al 50% de Wolframato o Tungstato. Si se tiene certeza que no hay drogas termolábiles puede calentarse hasta 70-80°C y filtrar en Kitasato a presión reducida. Los extractos son bastante limpios. Es un buen método para aislar drogas de naturaleza ácidos débiles (fenacetina, dipirona, ácido acetilsalicílico barbitúricos, hidantoínas, etc. No es bueno para drogas de naturaleza base débil.
Método de Dubney- Nickoll : El homogenato es tratado con sulfato de amonio, calentado y dejado en digestión durante varias horas. Luego es filtrado y el EALP esta listo para la extracción con disolventes orgánicos. Tiene buen rendimiento para drogas básicas (antidepresivos tricíclicos, fenotiacinas, etc) pero muy pobre para drogas de naturaleza ácida.
Métodos de extracción directa:

Método de Fassi:

Este método fue ideado por el toxicólogo argentino Agustin Fassi , basado en las técnicas de Kohn Abrest y Le Breton , que permiten el agotamiento cuantitativo y reducir a la vez el tiempo requerido en las técnicas clásicas. Esta técnica , con algunas modificaciones es la mas usada en nuestro medio, en los laboratorios forenses y que puede ser aplicado tanto a las viseras, sangre, vómitos, alimentos, etc.

Procedimiento:
Desmenuzar el material hasta formar una papilla homogénea, de la que se toman 10-20gs, se introduce en un mortero y se adiciona ácido tartárico sólido hasta franca reacción ácida al papel de pH.
Agregar a continuación sulfato de sodio anhidro en cantidad doble del peso de la papilla de la muestra problema, mezclando continuamente hasta formar una masa homogénea que se deja secar al aire en lugar templado y a temperatura inferior a 50°c. Una vez seca se disgrega el material y se hace un polvo fino. Se coloca luego en un cartucho de papel de filtro para incorporarlo a un soxlhet, o aplicar la siguiente modificación:
Se toma una ampolla de decantación que posee una prolongación de vidrio en la parte inferior de modo que tres prolongaciones formen una especie de

trípode, o se coloca un trozo enrollado de lana de vidrio, a continuación se coloca la muestra deseada y se procede a la extracción con los solventes orgánicos.



OBSERVACIONES:

- Este método se emplea para muestras complejas.
- Se debe dejar hasta que se seque y quede una muestra de consistencia no pegajosa.
- El agregado de ácido tartárico (ácido débil) tiene por finalidad formar las sales de las sustancias desconocidas de interés toxicólogico que estén presentes y dejarlas en solución y lograr una primer desproteinización.
- El sulfato de sodio anhidro elimina toda la humedad.
- No se usa calor y por lo tanto las sustancias termolábiles no son afectadas (si se sospecha efedrina o anfetamina se evaporará a temperatura ambiente ya que son compuestos muy volátiles)
- Si se utilizara una ampolla de decantación común esta deberá estar desprovista de aro de goma en el robinete ni tampoco tener tapón del mismo material, ya que se pueden producir interferencias por su posibilidad de absorción en la zona del UV y eventual poder reductor.

Adaptación usada en el laboratorio:

Una vez disgregado y convertido en polvo fino se coloca en un erlenmeyer con tapa esmerilada y se procede a la extracción del material del siguiente modo:

1. Se coloca a continuación tres porciones de éter de petróleo en cantidad suficiente hasta que sobrepase 1cm aproximadamente la superficie de la muestra se agita a intervalos de tres a cinco minutos, dejando en contacto aproximadamente 20 minutos (se deja en reposo hasta obtener una neta separación entre las fases) y se filtra recogiendo en un vaso de precipitados de capacidad adecuada.

Se evapora el éter de petróleo para posterior purificación.
Este extracto se denomina ETER DE PETROLEO ACIDO (aquí se encontraran principalmente plaguicidas).

2. A continuación se extraen de la misma manera con éter etílico, filtrándose y evaporándose el extracto obtenido.
Este será el extracto ETER ETILICO ACIDO(se extraen principalmente barbitúricos, analgésicos antipiréticos, hidantoínas, carbamatos, sulfamidas, glucósidos cardiactivos, glutetimidas, colchicina,etc).

3.Luego de la extracción se alcaliniza la muestra con amoníaco hasta franca reacción alcalina y se extrae nuevamente con éter etílico.
Esta será la fracción ETER ETILICO ALCALINO (las sustancias presentes serán:
Alcaloides, anfetaminas ,antidepresivos tricíclicos, anestésicos arilaminicos, diuréticos, fenotiacinas, benzodiacepinas, etc)
Los extractos son evaporados.

4.Por último se realiza una extracción con cloroformo, especialmente para extraer estricnina y morfina. Obtenemos el extracto CLOROFORMO ALCALINO.

Purificación de los extractos:
Se trabaja con ampolla de decantación.
FRACCION ETER DE PETROLEO ACIDO:
Se agrega al extracto seco 5ml de alcohol al 30% v/v, se filtra en frío y sobre la solución se hace la investigación toxicológica.
FRACCION ETER ETILICO ACIDO:
Agregar 10ml de agua destilada , calentar levemente para favorecer la disolución del residuo. Enfriar. llevar a pH=3 con ácido sulfúrico al 1% . extraer con 20ml de ciclohexano:cloroformo(25:75). Agitar durante 5 min. Filtrar la mezcla orgánica en un embudo de papel de filtro conteniendo una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro, para eliminar los vestigios de humedad. Evaporar y retomar en 1ml de metanol.
FRACCION ETER ETILICO ALCALINO:
Tomar el residuo con algunos mililitros de ácido sulfúrico al 5%. Extraer con éter etílico. Desechar la fracción orgánica. Alcalinizar la fracción acuosa restante con amoniaco y extraer 3 veces con porciones de 10ml de éter etílico. Filtrar ,evaporar y retomar con 1ml de metanol.

FRACCION CLOROFORMO ALCALINO:
Tomar el residuo con algunos mililitros de ácido sulfúrico al 5%. Extraer con cloroformo. Desechar la fracción orgánica. Alcalinizar la fracción acuosa restante con amoniaco y extraer 3 veces con porciones de 10ml de cloroformo. Filtrar,evaporar y retomar con 1ml de metanol.

Extracción en fase sólida: (SPE)

La extracción en fase sólida como método alternativo a la extracción liq-liq para el aislamiento de drogas de fluidos biológicos ha ganado mucha popularidad por las ventajas mismas que presentan estos métodos ,como son los altos rendimientos en la recuperación y la simplificación de la labor de manipulación, entre otras.
En estas técnicas los sorbentes pueden ser de tres clases de acuerdo a la naturaleza de la interacción que se lleve a cabo. De manera que tenemos sorbentes polares, no-polares y de intercambio iónico.
La mayoría de los reportes en cuanto a la extracción de drogas de fluidos biológicos se realizan con sorbentes no-polares ($C_{2,}C_8$,C_{18}).

De manera general todos estos procedimientos constan de 7 pasos fundamentales:

1. Acondicionamiento de la columna
2. Aplicación de la muestra.
3. Lavado de la columna
4. Ajuste de pH (si se lo requiere)
5. Secado de la columna.
6. Elución de la droga.
7. Concentración del extracto.

El principio es el mismo que utiliza la cromatografía liquida de alta resolución. En el paso de acondicionamiento el solvente abre las cadenas hidrocarbonadas lo que permite el incremento del área superficial para una mejor interacción con los analitos. Antes de la aplicación de la muestra debemos cerciorarnos que no contenga residuos que puedan tapar la columna, por lo tanto debemos centrifugar antes de su aplicación.
El lavado tiene como función fundamental remover selectivamente los compuestos endógenos de la matriz biológica para una elución posterior y obtener un extracto limpio. En la presente monografía se citara una de las técnicas mas empleadas en la extracción de drogas en matrices biológicas en el capítulo de **procedimientos de confirmación de los análisis : confirmación por HPLC.** (detalles pag.37)
Existen muchas firmas de estos tipos de columnas por ejemplo podemos mencionar: WorldWide Monitoring, Analytichem International, Supelco, Superclean, Alltech, Extract.Clean, Bond Elut, Sep-Pak.

Screening de drogas en sangre y vísceras utilizando hidrólisis enzimática y extracción en columnas en fase normal
(Clean Elut, para cadáveres preferiblemente)

A 5 g de hígado se le añade la enzima (5 mg de subtilicina A y 15 ml de buffer Tris 1 M). Se coloca 90 minutos a 60 °C, se deja enfriar y se ajusta el pH a 4 con ácido clorhídrico. Se centrifuga y el sobrenadante se divide en dos porciones, una se ajusta a pH ácido y la otra a pH alcalino. En dos columnas de tierra de diatomea se añaden las porciones y se espera 3 minutos. La elución se realiza con éter etílico para las drogas ácidas y con cloroformo:isopropanol 9:1 (dos porciones de 12 ml cada una). Se reúnen los extractos y se someten a los procedimientos de purificación.

Extracto clorofórmico:
Se extrae con 10 ml de H_2SO_4 0,5 N, se separan las capas y la capa ácida se hace alcalina nuevamente y se extrae con cloroformo: isopropanol 9:1. Se concentra el extracto.

Extracto etéreo: Se evapora casi a sequedad y se le añade de 3 a 4 ml de 0,5 N, H_2SO_4 se filtra y se extrae nuevamente con éter, se separa y se concentra posteriormente.

Debemos señalar que como se muestra en la tabla VII, existen diferentes tipos de columnas Clin- ELUT dependiendo de la cantidad de muestras que se quiera trabajar.

Tabla VII. Columnas de Tierra de Diatomea disponibles para los análisis.

Tipo de columna	Cantidad de muestra
CE 1000	de 300 ul hasta 3 ml

CE 1001	de 1 a 4 ml
CE 1003	de 3 a 6 ml
CE 1005	de 5 a 8 ml
CE 1010	de 10 a 12 ml (tejidos)
CE 1020	de 20 ml

Screening de drogas en orina y cabellos utilizando hidrolisis enzimática, ácida y alcalina seguida de extracción en fase sólida
(Columnas CERTIFY I)

En el caso de los pelos debemos recortarlos en pequeños trozos, se lavan bien con diclorometano, luego con agua destilada y nuevamente con diclorometano para que suelte toda la grasa y por último se realiza un lavado con metanol. Se toman 5 ml de orina o de 50 a 100 mg de cabello y se procede a realizar uno de los procedimientos de hidrólisis siguientes:

Hidrólisis Enzimática:

Se le añade a la muestra 60 ul de una mezcla de Glucuronidasa / arilsulfatasa y 1 ml de buffer fosfato de pH-6 y se encuba 14 horas a 37 °C.

Hidrólisis alcalina:
Se le añade a la muestra 1 ml de NaOH 0,1 M y se coloca 24 horas a 60 °C. Posteriormente se lleva a pH-6 con buffer fosfato.

Hidrólisis ácida:
Se la añade 1 ml de H_2SO_4 0.05 N y se encuba 12 horas a 37 °C. Posteriormente se lleva a pH-6 con buffer fosfato.
Las columnas se activan con 2 ml de metanol y 2 ml de buffer fosfato de pH-6 lentamente y no dejando que se seque, se aplica la muestra, se lava la columna con 0,5 ml de buffer fosfato y 1 ml de una mezcla de buffer fosfato : metanol 80:20 y 1 ml de ácido acético 1M. Se espera 2 minutos y se deja secar bien la columna, se centrifuga si es necesario. Se eluye con 1 ml de una mezcla de Hexano: Acetato de Etilo 80:20 (con esta mezcla se eluye el THC). Posteriormente se eluye con una mezcla de diclorometano: isopropanol: amoníaco 80:20:2. (esta mezcla eluye drogas básicas).

VI-Procedimientos de hidrólisis antes de la extracción:

Benzodiacepinas:

Las benzodiacepinas se excretan fundamentalmente conjugadas con el ácido glucurónico por lo tanto se necesita realizar una hidrólisis para poder llevar a cabo la extracción. La hidrólisis ácida de las benzodiacepinas produce benzofenonas. La hidrólisis ácida se efectúa añadiendo 3 ml de ácido clorhídrico concentrado por cada 10 ml de orina y se coloca a 100°C por 30

minutos, después de enfriar se somete a los métodos de extracción disponibles.

Acido del 11-nor-Delta 9-Tetrahidrocannabinol:

Este es el metabolito fundamental del Delta-9- THC el cual también se excreta conjugado en la orina con el ácido glucurónico, por tanto facilitamos su extracción mediante la hidrólisis en este caso alcalina. Por cada 10 ml de orina se añaden 2 ml de KOH 10 N y se coloca a 50 °C por 15 minutos, después se enfría se ajusta a pH - 2 con ácido clorhídrico y se somete a los métodos de extracción disponibles.

Morfina - Codeína:

La Morfina es el producto del metabolismo de todos los derivados del opio incluyendo a la Heroína. La morfina se excreta parte libre y parte conjugada con ácido glucurónico por lo tanto también es tributaria de un procedimiento de hidrólisis.

Hidrólisis ácida: Por cada 10 ml de orina se añade 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y se coloca a 100 °C por 1 hora.

Hidrólisis Enzimática: 10 ml de orina se ajusta a pH-7 si es necesario (con ácido acético) y se le añade 0,1 ml de un buffer pH- 5,5 (buffer acetato-ácido acético 0,1 M) y 0,02 ml de b- Glucuronidasa (75 unidades / ml) por cada ml de orina. Se incuba 24 horas a 37 °C ó 1 hora a 55 °C (la temperatura no puede exceder los
55 °C por que se puede desnaturalizar la enzima .

Es bueno señalar que tanto en el caso de las benzodiacepinas como del ácido 11-nor-Delta-9- Tetrahidrocannbinol también se puede utilizar la hidrólisis enzimática con b-Glucuronidasa.

Además de la orina, la sangre y los tejidos (hígado, cerebro) pueden ser sometidos a hidrólisis enzimática con el objetivo de romper la unión de las drogas con las proteínas y compuestos endógenos. Se reportan muchas técnicas que hacen uso de Subtilicina A con Cisteína, Neutrasa, Tripsina, Papaína con Cisteína, etc. En el caso de tejidos la hidrólisis con Papaína se han reportado buenos recobrados para las drogas alcalinas. La técnica a seguir es la siguiente:

Por cada 5 g de tejido homogeneizado se añaden 10 ml de agua y se coloca a 37 °C por 1 hora, después se diluye hasta 25 ml con un buffer fosfato de pH 7,4 0,002 M y se añade la enzima que consiste en 25 g de Papaína,Cisteína 0,005 M y EDTA 0,002 M, luego se incuba a 37 °C por 2 horas. Después se filtra, se hace alcalina con amoníaco (pH entre 8 y 10) y se realizan las extracciones con el solvente adecuado, dependiendo si es una determinación directa o si es un procedimiento de Screening.

- Metodología para el análisis de drogas en fluidos biológicos de manera directa

1-Determinación de Morfina en orina por Cromatografía en Capa Delgada.

Por cada 10 ml de orina se añade 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y se coloca en la estufa a 100 ºC durante una hora. Después se saca y se enfría, se ajusta a pH-8,6 - 9 y se realizan dos extracciones sucesivas con una mezcla de cloroformo: isopropanol, en una proporción de 9:1, se separan, se reúnen los extractos. Cuando se necesite realizar una limpieza del extracto se reextrae la capa orgánica con 6 ml de ácido clorhídrico, se desecha la capa orgánica, se ajusta la solución a pH entre 8,6 - 9 y se vuelve a extraer con la misma mezcla de solventes, se separa a través de sulfato de sodio anhidro, se lava el filtro con 5 ml de fase orgánica y se concentra a sequedad con corriente de aire. Después se reconstituye en 50 ul de metanol:cloroformo 9:1 y se aplica 20 ul en placas de sílica gel G 60 F-254 nm de 25 mm de espesor; desarrollándose el cromatograma en el sistema tolueno: acetona: etanol : amoníaco en una proporción de 45: 45: 7:3. Una vez desarrolladas las tres cuartas partes de la placa se saca, se deja secar y se revela sucesivamente con luz UV 254 nm, Dragendorf, Iodoplatinato y FPN (5 ml de solución de Cloruro férrico: 45 ml de ácido 20 % : 50 ml de ácido nítrico al 50 %). Después de cada paso se observa el cromatograma y se anota el comportamiento. Siempre se trabaja contra patrones de morfina y codeína puros para análisis y a una concentración de 1 mg / ml en etanol y se aplican de 5 a 10 ul. Después del reactivo de Dragendorff y Iodoplatinato se puede aplicar también el reactivo de fluorescencia y exponer la placa a la luz UV.

2-Determinación de morfina en sangre total.

A 10 ml de sangre se le añaden 25 ml de agua y 10 ml de solución saturada de sulfato de amonio y 2 ml de ácido clorhídrico concentrado, se tapa con papel de aluminio y se coloca a 120 ºC por 30 min. Se deja enfriar hasta 37 ºC y se filtra, con el filtrado se sigue el mismo procedimiento descrito en la determinación en orina.

3-Determinación de morfina en la bilis.

Por cada 2 ml de bilis se le añaden 4 ml de agua, 0,5 ml de ácido clorhídrico concentrado, se coloca 2 horas a 120 ºC, se enfría, se ajusta pH entre 5 y 7 con hidróxido de potasio 10 M y se sigue el procedimiento descrito anteriormente.

4-Determinación de morfina en Tejidos.

Se toman 2,5 g de tejido homogeneizado (hígado, riñón, encéfalo, etc.) y se le añaden 5 ml de una solución de sulfato de sodio saturado, 1 ml de HCL concentrado y se homogeneiza. Se coloca en una estufa a 120 °C por 2 horas. (hidrólisis ácida). Se filtra y se ajusta a pH-9 con NaOH 25 %. Se realizan dos extracciones con cloroformo:metanol 9:1 . Se reúnen los extractos orgánicos y se procede a la purificación, para esto se extrae con borato de sodio 0,05 M (7 ml) ($Na_2B_4O_710H_2O$). El objetivo de esta extracción es sacar las grasas fundamentalmente. Posteriormente la capa orgánica se somete a una extracción con ácido sulfúrico 1 N (8 ml). Se separa, a la capa de ácido se le agregan 2 ml de sulfato de amonio saturado para estabilizar el pH y se ajusta el mismo a 9 con NaOH 25 % y se extrae con cloroformo:isopropanol 9:1. Este extracto se concentra para posterior análisis.

5-Determinación de Cocaína y Benzoilecgonina en orina por Cromatografía en capa delgada.

Entre 5 y 20 ml de orina, se ajusta a pH- 8,6 con buffer amonio y se realizan dos extracciones sucesivas con cloroformo: isopropanol en una proporción de 1:1. Se separa a través de sulfato de sodio anhidro, se reúnen los extractos y se concentra. Se reconstituyen en 50 ul de metanol y se aplican 20 ul en placas de sílica gel G 60 F-254 nm de 25 mm de espesor y se desarrolla el cromatograma en el sistema cloroformo: metanol en una proporción 1:1. Una vez desarrollada las ¾ partes de la placa, se saca y se deja secar y se revela primeramente exponiendo la placa a la luz UV y después con Dragendorff seguido de Iodoplatinato seguido de FPN. Se trabaja contra patrones de cocaína, benzoilecgonina y ecgonina metilester a una concentración de 1 mg / ml en metanol y se aplican 5 ul en cada placa.

-Confirmación de benzoilecgonina en orina por UV.

Por cada 10 ml de orina se le añade 5 gr de una mezcla de $NaHCO_3$ y K_2CO_3 en una proporción de 2:1 en peso. La muestra se extrae 2 veces (25 ml cada una) con cloroformo: isopropanol en una proporción 9:1. Se separan las capas, se reúnen los extractos filtrando a través de sulfato de sodio anhidro y se realiza una extracción con ácido sulfúrico 0,1 N. Se hace básica la capa ácida por la adición de amoníaco y se extrae con 15 ml de cloruro de n-butilo y se le añade 2 gr de mezcla. Se vuelve a extraer con 25 ml de la mezcla cloroformo: isopropanol (9:1), se reextrae con 2 ml de ácido sulfúrico al 0,1 N, se realiza el espectro UV. Después se le añaden a la muestra y al patrón 100 ul de hidróxido de sodio 10 M y se vuelve a realizar el espectro a 0,5 min. y a 5 min. después de la adición del hidróxido de sodio. Aquí es importante observar los cambios que ocurren en el espectro con la adición del NaOH, debido a que debe haber una disminución apreciable del máximo de absorción tanto en la muestra como en el patrón.

- Extracción en fase sólida de Cocaína con tierra de diatomea (Columnas Extrelut).

Es importante señalar que en todos los procedimientos de extracción en fase sólida debe seguirse en principio las recomendaciones del fabricante, pero de

manera general se puede seguir el siguiente procedimiento: 20 ml de orina se ajusta a pH - 9 con buffer amonio. Se añade la muestra en una columna conteniendo 3g (NT3)de tierra de diatomea y se espera a que penetre unos 10 a 15 minutos. Posteriormente se eluye con 15ml de eter etilico .
Posteriormente se concentra el extracto.

-Determinación de cannabinoles en orina por Cromatografía en capa delgada.

Por cada 10 ml de orina se añade 2 ml de KOH 10 M y se coloca en la estufa a 60ºC durante 15 min. Después de enfriar, se ajusta a pH-2 con ácido 2 N y se realizan 2 extracciones sucesivas con una mezcla de ciclohexano: acetato de etilo en una proporción de 7:1. Se separa a través de sul;fato de sodio anhidro y se concentra. Posteriormente se reconstituye en 50 ul de metanol y se aplican 20 ul en placas de sílica gel G60 F-254 nm de 25 mm de espesor y se desarrolla en el sistema Hexano: 1,4 dioxano: metanol en una proporción de 30: 10: 5. Se saca cuando haya desarrollado las ¾ partes de la placa y se deja secar. Se revela con azul sólido B recientemente preparado y frío(25 mg de sal de azul sólido B o BB en 10 ml de KOH 0,1 M). Siempre se trabaja con patrones de referencia de THC y de su metabolito el 9-carboxi-THC.

- Determinación de anfetamina, metanfetamina y derivados en orina por Cromatografía en capa delgada.

Por cada 2 ml de orina se añaden 2 ml de KOH 1 M y 5 ml de agua, comprobar que el pH sea 11. Se realizan 2 extracciones sucesivas con cloroformo o diclorometano. Se separa a través de sulfato de sodio anhidro y se reúnen los extractos y se añaden 50 ul de metanol ácido (CH3OH: HCl(c) 9:1) y se concentra, posteriormente se reconstituyen 50 ul de metanol. Se realiza la cromatografía en capa delgada en placas de sílica gel G 60 F-254 nm, de 25 mm de espesor. Se aplican 20 ul y se desarrolla el cromatograma en metanol: amoníaco en una proporción de 100:1,5. Cuando haya corrido las ¾ partes se saca, se seca de manera que no queden trazas de amoníaco y se revela con uno de los siguientes reveladores:
- Fast Black K 1% en agua, seguido de NaOH 1 M.
- Ninhidrina 10% en etanol y colocar 15 min a 120 ºC
- Reactivo de Simon.
- Fluorescamina 10 mg en 50 ml de acetona.

Los patrones de referencia de anfetamina, metanfetamina, etc se preparan a una concentración de 5 mg / ml y se aplican 1 ul de cada solución en cada placa.

1- Determinación de barbitúricos en sangre por espectrofotometria UV.

A 2 ml de sangre se le adicionan 50 ml de agua destilada, se homogeneiza y se le adicionan 15 ml de Tungstato de sodio al 10 % en agua y 15 ml de H2SO4 al 2 %.
Se coloca 3 minutos a 100 °C. Se filtra y el filtrado se somete a dos extracciones con éter etílico. Se reúnen los extractos y se extrae con 10 ml de NaOH 0,45 M.

Se registra el espectro UV contra patrón de NaOH 0,45 M. Posteriormente a 3 ml de este extracto se le añaden 0,5 ml de NH_4Cl al 16 %.
Se hace lo mismo con el blanco (para llevar de pH - 13 a pH -10) y se registra el espectro nuevamente.
En presencia de un barbitúrico se observa un corrimiento batocrómico.

1- Determinación de benzodiacepinas en orina por cromatografía en capa delgada.

Por cada 5 ml de orina se le añaden 0,5 ml de HCl concentrado y se coloca 2 horas a 120 °C.
Se enfría y se realizan dos extracciones con 2 ml de cloroformo cada una.
Se separa se reúnen los extractos, se filtra a través de sulfato de sodio anhidro y se concentra.
Se aplican 20 ul en placas de sílica Gel G 60 F-254 nm de 25 mm de espesor y se desarrolla en Cloroformo : Acetona 9:1.
Los patrones de referencia se preparan a una concentración de 0,1 mg / ml en HCl 1 M, se pueden si están disponibles los principales metabolitos de las benzodiacepinas, además la benzofenona.
El revelado se realiza primeramente exponiendo la placa a la luz UV, posteriormente se revela con nitrito de sodio 0,5 % en HCl 1N y después con difenilamina al 0,5 % en agua. Las manchas son de color rosado y algunos diuréticos también dan reacción positiva.
En la literatura se reportan muchos procedimientos para la determinación de drogas en forma directa, que hacen uso de la extracción en fase sólida seguida de cualquiera de las técnicas descritas anteriormente o de otras como la cromatografía de gases o la líquida de alta presión.
En la Tabla VIII aparece un ejemplo del uso de columnas Clean Screen® para la extracción de drogas de abuso.
Estas columnas son copoliméricas en un soporte rígido de sílica gel y tienen un componente hidrófobo y otro de intercambio iónico.
Los eluatos resultantes se concentran y se somete a un proceso de derivatización si se va ha realizar cromatografía de gases o sencillamente se reserva el extracto para realizar una cromatografía en capa delgada en las condiciones óptimas que se describieron anteriormente en cada paso.

Tabla VIII. Condiciones para la determinación en fase sólida de drogas de abuso con columnas Clean Screen®.

Clean Screen ®	Muestra	Columna	Lavado	Elución
Antidepresivos	pH- 6 con B. Fosfato	Metanol H2O DI B.fosfato	H2O DI Ac.Acetico Metanol	Cl.Metileno Isopropa-nol, NH3 78:20:2
Barbitúricos	pH- 6 con B. Fosfato	Metanol H2O DI	H2O Ac.Acético	Hexano Ac.Etilo

		B.fosfato	Hexano	50:50
Benzodiacepinas	pH-9 con B. Borato	Metanol H2O DI B. Borato	Metanol 10% Hexano	Cl.Metileno Isopropa-nol, NH3 78:20:2
Delta-9 THCCOOH	pH-3,5 con Ac.Acetico	Metanol H2O DI HCl 0,1 N	H2O DI Aceton.itrilo 40% HCL 0,1 N	Hexano Ac.Etilo 50:50
Cocaína BE	pH-6 con B. Fosfato	Metanol H2O DI B. Fosfato	H2O DI HCl 0,1 N Metanol	Cl.Metileno Isopropa-nol, NH3 78:20:2
Morfina Codeína	pH-6 con B. Fosfato	Metanol H2O DI B. Fosfato	H2O DI B.Fosfato Metanol	Cl.Metileno Isopropa-nol, NH3 78:20:2
Anfetaminas	pH-6 con B. Fosfato	Metanol H2O DI B. Fosfato	H2O DI B. Fosfato Metanol	Cl.Metileno Isopropa-nol, NH3 78:20:2

-Procedimientos de Confirmación de los análisis

1- Confirmación por Cromatografía de Gases:

En la literatura especializada se reportan muchos métodos de confirmación de los resultados de los screening de las drogas de abuso. La cromatografía de gases, aunque también se puede usar para realizar screening, es una magnífica técnica de confirmación de los inmunoensayos y de los procedimientos de cromatografía en capa delgada.

La eficiencia de los métodos de confirmación por cromatografía de forma general dependerán de la columna cromatográfica en cuestión. Son muy útiles las columnas empacadas o capilares conteniendo fases estacionarias tales como SE-30, OV-1, SE-54, OV-17, OV-225 ya que sirven para la separación de una gran gama de drogas ácidas y básicas.

Un aspecto importante es garantizar que las condiciones de la columna se mantengan estables durante los análisis, para esto como medida de precaución deben cromatografiarse muestras controles antes y después de las muestras por confirmar. También las columnas deben acondicionarse al menos 30 °C por encima de la temperatura a la cual se van ha realizar los análisis y durante 15 horas, no debiendo sobrepasar la temperatura máxima recomendada por el fabricante. Ahora cuando la droga se va ha cuantificar es esencial realizar una curva de calibración al mismo tiempo que se están corriendo las muestras y por supuesto las muestras de la calibración deben estar en la misma matriz que las muestras por cuantificar.

Otro aspecto radica en que en la mayoría de los casos es esencial realizar procedimientos de derivatización, antes de proceder a los análisis cromatográficos

La derivatización de los extractos, aunque prolonga el tiempo requerido para realizar un análisis, disminuye su costo, mejora la especificidad, la sensibilidad, la precisión, la linealidad de los análisis, mejora la estabilidad de los analitos y evita la descomposición térmica de los mismos.

Son susceptibles de una derivatización las moléculas que contengan grupos funcionales tales como -COOH, -OH, -SH, y NH_2, y los procedimientos mas utilizados son la silanización, (para compuestos que contienen grupos -OH, -

NHR o NH_2) alquilación, y acilación. Hidrógenos activos en las moléculas se sustituyen generalmente por tres grupos alquilos.
Los agentes derivatizantes mas utilizados en el análisis de drogas son:

- N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA).
- N,O-bis-trimetilsililacetamida (BSA).
- N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA).
- Hexametildisilasano (HMDS) + piridina.
- Trimetilclorosilano (TMCS) + piridina.
- Anhidrido Pentafluoropropiónico. (PFPA).
- Anhidrido Trifluoroacético (TFAA).
- N-metil-n-ter-butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA).
- t-butildimetilsililtrifluoroacetamida (TBDMTFA).
- Hidróxido de Tetrametilamonio (TMAH).
- Anhidrido Heptafluorobutírico (HFBA).

De modo que la silanización, la alquilación y la acilación son los procedimientos de derivatización más utilizados en los análisis de drogas por Cromatografía de gases ó por CG acoplada con la espectrometría de masas.
Es importante hacer notar que los derivados se preparan poco tiempo antes de realizar los análisis, debido a que algunos de ellos se pueden descomponer.
A modo de ejemplos citaremos algunas técnicas de confirmación por cromatografía de gases reportadas en el manual de las Naciones Unidas ST/NAR/27.

a) Confirmación de Morfina por CG:

El extracto de la orina evaporado a sequedad en un tubo cónico, se le añaden 20 ul de BSTFA ó BSA y se calienta a 85 °C por 15 minutos. Estos agentes se pueden mezclar con piridina en una proporción de 1:1 e inyectar directamente en el cromatógrafo.

Condiciones cromatográficas:

- Columna: de 2 m por 2-4 mm DI empacada con dimetilsilicona (SE-30) o Fenilmetilsilicona con 50 % de fenilo (OV-17).
- Gas Portador: N2 70 ml / min.
- Temperaturas: Inyector: 275 °C
- Horno: 230 °C
- Detector (FID): 275 °C

b) Confirmación de Cannabinoles por CG:

El extracto de la orina evaporado a sequedad en un tubo cónico, se le añaden 50 ul de BSTFA y de TMCS y se calienta a 60 °C por 10 min.

Condiciones Cromatográficas:

- Columna: de 2 m por 2 mm DI empacada con dimetilsilicona al 3 % (OV-1) o 3 % de fenilmetilsilicona y 50 % de Fenilo (OV-17).
- Gas Portador: N2 o He 30 ml / min.-
- Temperaturas: Inyector: 260 °C.

- Horno: 255 °C.
- Detector (FID): 275 °C

c) Confirmación de Cocaína por CG:
El extracto de la orina evaporado a sequedad se le añaden 50 ul de PFDA y 25 ul de pentafluoropropanol y se calienta la mezcla a 90 °C por 15 min. Se evapora a sequedad y se reconstituye en 25 ul de acetato de etilo.

Condiciones Cromatográficas:
- Columna: de 2 m por 2-4 mm DI SE-30, OV-1 o OV-17.
- Gas Portador: N2 30 ml / min.
- Temperaturas: Inyector: 220 °C.
- Horno: 220 °C.
- Detector (FID): 300°C.

d) Confirmación de Anfetaminas y análogos por CG:
El extracto de la orina evaporado a sequedad en un tubo cónico se le añaden 50 ul de HFBA y se calienta a 75 °C por 20 min. Se evapora a sequedad y se reconstituye en 50 ul de acetato de etilo y se inyectan de 1-2 ul en el cromatógrafo.

Condiciones Cromatográficas:
- Columna: de 2 m por 3-4 mm DI , OV-1, SE-30 o OV-17
- Gas Portador: N2 30 ml / min.
- Temperaturas: Inyector: 250 - 280 °C.
- Horno: 90 - 280 °C (programada).
- Detector (FID): 280 - 300 °C.

2.A-Cromatografía Líquida

generalidades

La introducción de la cromatografía de gases en la década de 1950 y de la cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), quince años después, dotaron a la química y a las ciencias de la vida con dos poderosas herramientas.

El meteórico crecimiento de la cromatografía líquida (1970-1980) ha sido particularmente impresionante pero no sorprendente en vista de su amplia aplicación, con posibilidad de análisis de compuestos térmicamente inestables, que exhiben baja volatilidad, con altos pesos moleculares y/o amplios rangos de polaridad (Zuccaro y col. 1997; Poletini, 1999).

Una de las contribuciones más significativas al establecimiento de la cromatografía líquida como técnica analítica de rutina fue la introducción de la fase reversa químicamente enlazada, ya que puede ser usada para una gran variedad de compuestos orgánicos, no iónicos, ionizables e iónicos, con la

apropiada elección de aditivos en las fases móviles, dentro de las limitaciones de los pKa y de pH.

Además de esta versatilidad, que ha hecho que se vayan resolviendo los problemas de separaciones, ofrece la posibilidad de inyección de muestras acuosas, considerada inicialmente como una gran ventaja y de distintos sistemas de detección tales como ultravioleta-visible, fluorescencia (natural o formación de derivados pre o post-columna), electroquímico, etc.

Sin embargo dos cuestiones han dificultado su utilidad para el barrido de compuestos en una sistemática toxicológica:

1ª. El requerimiento de establecer una colección de datos de tiempos de retención, ya que en HPLC están influenciados por la reproducibilidad de los mismos (incluso con idénticos materiales de empaquetado), diferencias en parámetros técnicos e instrumentales, tamaño de columna, volúmenes muertos y diferente precisión en los sistemas de bombeo con la consecutiva variación en la composición de la fase móvil o perfil del gradiente (Bogusz y col. 1991).

2ª. La pobre especificidad de una detección a una simple longitud de onda en el ultravioleta-visible, método de detección mas usado (Logan y col. 1990).

Estado del tema:

Los avances tecnológicos en los equipos, columnas y detectores han mejorado el control de los factores que afectan al comportamiento de la retención y a la reproducibilidad.

A pesar de la buena situación actual de la HPLC en el análisis toxicológico, se siguen presentando problemas que podemos clasificar en:

- Asociados a la instrumentación: presión, fugas, chequeo de válvulas, mezcladores, lámparas del detector etc. Suelen ser simples después de identificarlos, aunque es irritante y tedioso. Pueden prevenirse con un buen mantenimiento.
- Asociados a la separación propiamente dicha: linea base, tiempos de retención (cambio de columna, fases móviles, tipo de columna, temperatura...), perfiles de los cromatogramas (colas en los picos, picos fantasmas, negativos, dobles o asimétricos, anchos...), inestabilidad del detector, etc. El síntoma es obvio, suelen ser difíciles de identificar y a veces imposibles de corregir.

En algunos casos se sigue aprovechando la oportunidad de inyección de muestras acuosas o bien la filtración y precipitación directa con disolventes. Sin embargo, la complejidad de los fluidos biológicos y los casos en que bajas concentraciones pueden ser tóxicas, aconsejan extracción, purificación y concentración, bien de forma independiente de la determinación, donde la fase sólida compite con la extracción líquido-líquido, o en línea con el cromatógrafo con pre-columnas para pre-concentración y purificación y posterior envío a la columna analítica (column switching), pre-tratamiento con diálisis etc., que permiten la inyección directa de la muestra sin pérdida de analitos durante pasos críticos como la evaporación. Esto mejora la recuperación, sensibilidad y

reproducibilidad (Campins-Falcó y col. 1993; Deinl y col. 1999; Drummer, 1999).

Respecto a las columnas, la evolución en fases estacionarias de gel de sílice (fase normal), quirales o exclusión son patentes, aunque la fase reversa químicamente enlazada sigue siendo la más usada para compuestos de interés en la sistemática toxicológica. La producción de fase reversa de alta pureza, libre de metales y desactivada es quizás el más importante desarrollo en este tipo de columnas en los últimos 15 años. Los recientes avances han conseguido una distribución homogénea de la acidez de los grupos silanoles con lo que las columnas son más estables y generan picos reproducibles, agudos y simétricos, sin embargo no llegan a evitar las colas de algunos compuestos básicos que requieren la adición de una base competitiva a bajos pH o la adicción de contraiones (par iónico) para compuestos fuertemente ácidos o básicos (Gupta, 1992; Poletini, 1999).

En general se considera preferible la elución isocrática ya que el comportamiento de la retención es más reproducible, la contribución al fondo por la fase móvil en el espectro de UV-Vis no cambia durante el cromatograma y el cuantitativo es más eficaz. Sin embargo para cubrir el amplio rango de compuestos se han propuesto eluciones en gradiente o columnas con diferente fase estacionaria acopladas en serie (Drummer, 1999).

A estas mejoras en la separación se ha unido la práctica generalización del uso del detector de fotodiodos (Diode Array Detector, DAD) que posibilita la obtención de datos del espectro UV durante el tiempo de cromatograma y la detección de impurezas, aplicando el análisis multicomponentes para efectuar análisis cuantitativos válidos independientemente de la resolución o anchura de pico. Es muy versátil y ofrece importantes ventajas, comparado con el detector UV convencional, en el barrido de muestras desconocidas (Lambert y col. 1997). Otros tipos de detectores (fluorescencia, electroquímico) más sensibles y específicos, no se utilizan en barridos de muestras desconocidas ya que suelen necesitar derivatización y no suelen permitir eluciones en gradiente (Theodoridis y col. 1995).

El potencial del detector de fotodiodos para picos no resueltos fue un progreso en el análisis de muestras biológicas, de naturaleza muy compleja. Junto con la HPLC ofrece la posibilidad de utilizar la retención cromatográfica como un parámetro de identificación, bien manejando escalas de índices de retención o tiempos de retención relativos con el consecuente intercambio de bases de datos de HPLC-DAD para posibles contactos inter-laboratorios, o unidades de tiempo de retención en usos intra-laboratorio (Elliott y col. 1998; Bogusz, 1991,1999). Esto se ha manifestado en la publicación de numerosos trabajos en que se describen aplicaciones de la HPLC a la detección de un gran número de compuestos y/o sistemática toxicológica general. (Koves y col. 1992; Drummer, 1999; Poletini, 1999).

Sin embargo, a pesar de las purificaciones cuidadosas ciertas interferencias pueden inducir a resultados falsos positivos o impedir apropiada identificación y cuantificación de los compuestos de interés, además de la conocida limitada especificidad del espectro UV y su variabilidad como función del pH. Por esas

razones los toxicólogos hemos estado esperando el acoplamiento entre HPLC y espectrómetro de masas. La interfase ha sido siempre el punto débil en dicho acoplamiento ya que tiene que eliminar la fase móvil y transformar las moléculas, disueltas en dicha fase móvil, en iones en fase gaseosa, sin degradación térmica (Marquet y col. 1999). Se han usado diferentes tipos de interfases, analizadores de masas y modos de detección. Sin embargo, la bibliografía más reciente en toxicología analítica se centra en las que utilizan ionizaciones a presión atmosférica, electrospray e ionización química en combinación con detector de espectrometría de masas (M. Bogusz, 2.001) o tandem masas-masas (Maurer, 1998). Ambas interfases suelen ir instaladas en el mismo instrumento y pueden seleccionarse indistintamente. Respecto a la sensibilidad, como una función de las polaridades de los analitos, son complementarias (Hoja y col. 1997).

TENDENCIAS FUTURAS

Aunque toda previsión de futuro conlleva un riesgo, se intuye que la cromatografía líquida mantendrá su posición como herramienta en la toxicología analítica, con el consecuente cambio y adaptación.

Se será más exigente con la estabilidad química y aumento del periodo de vida de las columnas. En los últimos años no se aprecia una tendencia clara a menor tamaño ni diámetro, a pesar de que se reduciría el uso y coste de disolventes y disminuirían los requerimientos al acoplar el detector de masas (Maurer, 1998).

La combinación de la versatilidad de la separación por HPLC con la selectividad de la detección por espectrometría de masas, con interfases a presión atmosférica, tendrá que salvar los obstáculos que todavía limitan su aplicación, especialmente en lo que respecta a la reproducibilidad de los espectros de masas, condiciones de ionización estandarizadas, y estudios sistemáticos, decisivos para ser técnica de identificación en toxicología (Poletini, 1999; Bogusz, 1999). Otro factor limitante es su alto costo de adquisición y mantenimiento aunque bajará e indudablemente se harán mas pequeños y de mas fácil manejo (Maurer, 1999).(Drummer, 2002)

Sin embargo su introducción en el análisis toxicológico ha abierto nuevas perspectivas de determinación simultánea de grupos de compuestos no derivatizables y metabolitos polares (Bogusz y col. 1998).

En la actualidad ninguna técnica instrumental es autosuficiente para el barrido de todos los compuestos, es por ello que asistiremos a la generalización de acoplamientos, quizás en algunos casos sofisticados, entre ellas, lo que ya supone

Nuevas estrategias analíticas.

2.B-Confirmación por Cromatografía Líquida de Alta Presión:

Se han reportado muchos métodos para el análisis de drogas de abuso empleando la HPLC, con diferentes sistemas de detección, incluso se reportaron metodología de screening por esta técnica.

En el manual de Naciones Unidas ST/NAR/27 se reportan procedimientos de confirmación por HPLC para la Morfina, Cannabinoles, Cocaína y anfetaminas en general.

Citaremos en este item algunos de los trabajos publicados en los distintos journals y revistas de divulgación como ser Journal of chromatography, Journal of chromatographic Science, Journal of Analytical Toxicology, Forensic Science International, Forensic Science, etc.

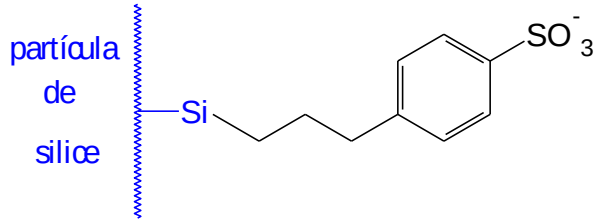
Screening rápido para drogas básicas, ácidas, neutras y sus metabolitos en fluidos biológicos y tejidos por HPLC con detector de Arreglo de Diodos HPLC-DAD

En este método se usa la extracción en fase sólida por intercambio catiónico e interacciones hidrofobicas para aislar las drogas y/o metabolitos del fluido o preparado de tejidos sea con propósitos Forenses pst-mortem, antidoping, screening preocupacional o bien propósitos clínicos.
Por esta técnica se pueden extraer con alta eficiencia gran cantidad de drogas en orina, plasma, contenido estomacal, preparado de viseras, alimentos, medicamentos, etc.
Para la identificación y caracterización mediante métodos cromatográficos, la programación de temperaturas (gradiente) en cromatografía gaseosa capilar es muy conocida para un screening de drogas, por que mediante una simple corrida pueden analizarse gran número de compuestos y por la eficacia en la confiabilidad. La técnica GC/MS se prefiere para la identificación estructural. Sin embargo en GC es dificultoso analizar algunos compuestos polares, termolábiles y no volátiles.
El uso de RP-HPLC para un screening de drogas no ha recibido la misma atención debido a la pobre especificidad de una detección UV a longitud de onda simple (el método mas ampliamente usado en los principios de la HPLC) y por que la naturaleza selectiva de la separación usualmente se destina a separar solamente pocos componentes.
El advenimiento de los detectores UV/Visible por arreglo de diodos (DAD) para HPLC ha perfeccionado la selectividad de la técnica mencionada, de tal manera que este puede dar datos múltiples acerca de cada pico, permitiendo la identificación a través de los tiempos de retención , espectros de absorción y coincidencia espectral.
Este método permite asegurar, dentro de ciertos limites la integridad de un pico cromatográfico.
Este detector, como es sabido, puede medir la señal no solo a una longitud de onda discreta sino el espectro de absorción completo en tiempo real, de modo que a las dimensiones habituales de tiempo y absorción, se agrega una tercera, la longitud de onda, permitiendo apreciar los detalles que escapan a detectores convencionales.
Monitoreamos y almacenamos de esta forma la información relativa a todo el espectro de absorción, y podemos luego manipular y recuperar la información

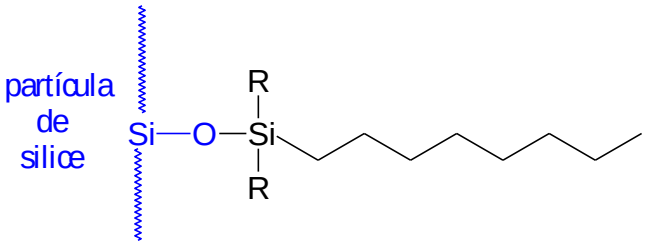
de manera de obtener la mejor señal cromatográfica de un pico cromatográfico de interes.
Podemos observar así los espectros bidimensionales clásicos AU = f(t_r) y tridimensionales (AU, t_r, λ).
La identificación se realiza a través de la comparación de los espectros UV y el tiempo de retención relativo (calculados con dos estándares internos).
Existen librerías espectrales de gran cantidad de drogas.
Esta técnica tiene el inconveniente de la baja sensibilidad del DAD para drogas con baja absortividad.
Con el software correspondiente podemos llevar a cabo un análisis espectroscópico derivado (primera , segunda, tercera y cuarta derivada) y determinaciones de pureza de pico (peak purity).
Este estudio describe como la combinación la eficiente técnica de extracción en fase sólida (SPE) y una elución en gradiente (o socrática) por HPLC-DAD, mejora el rango de detección y especificidad respectivamente y provee confiable y poderosa herramienta para la aplicación en screening de drogas.
La técnica de HPLC-DAD se ha probado para el screening de anabólicos, neurolépticos, diuréticos, drogas básicas, oligopéptidos, drogas ácidas y muchos otros compuestos.

ESTRACCION:

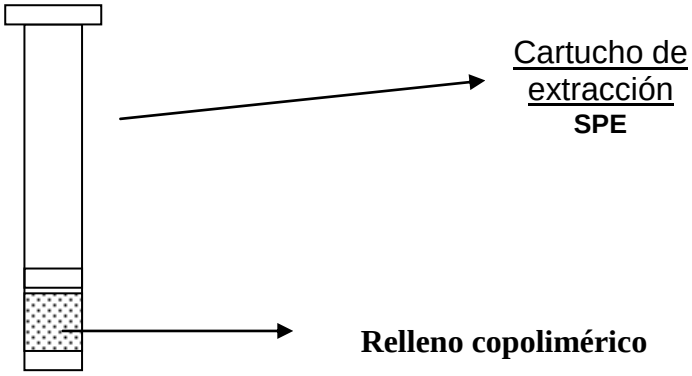
Se usan solventes y reactivos de grado HPLC.
La SPE se realiza en columnas Clean Screen de un mililitro copolimérica (WORLD WIDE MONITORING o similares como de la firma Analytichem).
estas contienen partículas de sílica de 40μm enlazadas químicamente a grupos alquilo (C_{18},C_8) y a grupos bencenpropilsulfonico (intercambio catiónico). Estos le dan la aptitud al relleno de participar en ambas interacciones no polares y de intercambio catiónico.



Fracción copolimérica de intercambio catiónico



Fracción copolimérica no polar



PROCEDIMIENTO: el siguiente protocolo es aplicado para el análisis forense de drogas en distintas matrices.

PREPARACION DE LA MUESTRA

ORINA:

A 5 ml de orina se añaden 150 a 300 μl de ácido acético para ajustar el pH entre 4.8 y 5.5.

SANGRE COMPLETA:

A 2 ml de sangre se le añaden 8 ml de H_2O destilada. Mezclar en vortex y dejar reposar 5 minutos.
Adicionar 150 a 300 μl de ácido acético para ajustar el pH entre 4.8 y 5.5.
Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm y descartar el pellet.

TEJIDOS:

Homogeneizar 1 parte de tejido con 3 partes de H_2O destilada.
Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm y descartar el pellet.
Transferir 10 ml de sobrenadante a un tubo limpio.
Adicionar 150 a 300 μl de ácido acético para ajustar el pH entre 4.8 y 5.5.

Acondicionamiento de la columna de extracción Clean Screen:

1x3 ml de metanol, aspirar (no dejar que se seque la columna)
1x3 ml de agua (d), aspirar (no dejar que se seque la columna)
1x1 ml de buffer fosfato pH=6.0 , 100mM, aspirar (no dejar que se seque la columna)

aplicación de la muestra:

cargar de 1 a 2 ml/min.
Lavado de la columna:
1x3 ml de buffer fosfato pH=6.0 , 100mM, aspirar
1x1 ml de ácido acético 100mM, aspirar
secar la columna(5 minutos a 10 “Hg)
1x3 ml de hexano,aspirar.

Elución de drogas ácidas y neutras (fracción A):
2x2 ml de diclorometano, colectar el eluato a 5ml/min.
Evaporar el extracto a temperatura menor de 40°c.

Lavado de la columna:
1x2 ml de metanol, aspirar.
secar la columna(5 minutos a 10 “Hg).

Elución de drogas básicas (fracción B):
1x2ml de metanol/NH_4OH(98/2)
colectar el eluato a 1 o 2 ml/min.
Evaporar el extracto a temperatura menor de 40°c.

Los extractos se retoman con el solvente de corrida o bien con metanol en el menor volumen posible y se carga a los viales correspondientes para ser posteriormente inyectados al cromatógrafo.
Previamente a la inyección de la muestra deben correrse los testigos (estándares) de las presuntas drogas que se presupone posee la muestra o bien construir una biblioteca de espectros de absorción y tiempos de retención corriendo en forma individual la cantidad de compuestos que se deseen ingresar a dicha biblioteca.
Debe tenerse en cuenta que las condiciones cromatográficas que se empleen al construir la biblioteca deben ser rigurosamente respetadas al correr la muestra incógnita.

EQUIPO:

- Marca comercial y modelo: Waters Alliance 2690
- Detector: PDA 990 (Waters)
- Software: Workstation Millenium ^{32}
- Inyector: automático $V_{maximo\ de\ inyección}$=100μl , $V_{minimo\ de\ inyección}$=1μl
  5 carruseles de 24 viales cada uno (120 viales en total)
- Guarda columna: RP 18 de waters
- Columna Waters RP 18, 10 μm, 250mm x 4 mm(Di)

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS:

Modalidad isocrática:

- Fase móvil: Acetonitrilo:buffer Pi, pH=3.2 (0.05M)
  30 : 70
- intervalo de longitud de onda: 210nm – 400nm
- flujo: 1ml/min
- volumen de inyección: 10μl-20μl para estándares de concentración aproximadamente 1 mg/ml y una dilución posterior 1:100.

- Temperatura de la columna: 30°c.

- Resolución: 1.2

Modalidad gradiente:

- Fase móvil:

La composición inicial de la fase móvil fue 10 % de Acetonitrilo en buffer Pi, pH=3.2 (0.05M). esta se incrementó a 50% luego de 15 minutos y se mantuvo la composición por 5 minutos.
Se requirió un tiempo de reequilibrio de 5 minutos entre inyecciones.

- intervalo de longitud de onda: 210nm – 400nm

- flujo: 1ml/min

- volumen de inyección: 10μl-20μl para estándares de concentración aproximadamente 1 mg/ml y una dilucion posterior 1:100.

- Temperatura de la columna: 30°c.

- Resolución: 1.2

Tiempo de análisis promedio: 30 minutos

BIBLIOTECA:

Se emplearon estándares individuales de drogas ácidas, alcalinas, neutras y anfóteras en una concentración de 0.8mg/ml y una dilución posterior 1:100 y se inyectaron al cromatógrafo.
El espectro obtenido para cada droga, el tiempo de retención y la cantidad inyectada se ingresan a la biblioteca.
Esto se repite para el numero de sustancias que se deseen ingresar a la biblioteca.

RESULTADOS Y DISCUSION:

En estos métodos, en los que se obtienen no solo los tiempos de retención sino los espectros UV completos, pequeños cambios en la composición de la fase móvil o calidad de los reactivos, pueden alterar la absorbancia máxima y/o la forma espectral con la suma del cambio en los tiempos de retención.

Cambios producidos en uno o todas estas características puede interferir con la identificación de los picos cromatográficos e incurrir en errores.
Por esta razón, se recomienda que cada laboratorio prepare su propia base de datos de tiempos de retención y librería espectral bajo las condiciones locales.
La sensibilidad del método varía de compuesto a compuesto, como una función del coeficiente de extinción molar de los compuestos de interés.
Se demostró que la sensibilidad del detector PDA es menor que la de instrumentos de longitud de onda simple. Las sensibilidades típicas de los compuestos de la tabla siguiente están en el orden de 0.05 a 0.1 μg/ml.

Anfetamina
Benzoilecgonina
Cafeína
Cocaína
Codeína
Diazepam
Dihidrocodeina
Efedrina
MDMA
Metanfetamina
Morfina
Oxazepam
Fenilpropanolamina
Propoxifeno
Teobromina
Teofilina

La sensibilidad es también función de la resolución del instrumento la cual varia entre los fabricantes.

Para la identificación confiable de drogas a bajos niveles sin embargo, es necesario reemplazar la resolución a costos de la sensibilidad.
En este trabajo se realizo la experiencia con drogas básicas, mencionadas en la lista anterior.
Primeramente se corrieron todos los estándares de manera individual y se llevo a cabo la biblioteca correspondiente (tiempos de retención y espectros de absorción), posteriormente se preparo una solución madre que contenía los estándares corridos anteriormente y se procedió a extraerlo por SPE.
Se evaporo el extracto, y se retomo con el solvente de corrida y se corrió en el cromatógrafo.
El resultado muestra una recuperación completa para todos los compuestos ensayados excepto para cafeína, teofilina y teobromina, debido a que estos 3 compuestos tienen grupos funcionales básicos muy débiles (pKa= 1 o menor) y no pueden ser completamente protonados al pH de extracción y no son totalmente retenidos.
Este procedimiento demuestra la performance del método extractivo SPE.
Este es un muy buen método para extraer morfina, oxacepam y benzoilecgonina, 3 compuestos anfóteros que tienden a ser difíciles de extraer por métodos de extracción liq-liq.

Sin embargo no resulto adecuado para anfetamina, metanfetamina y MDMA ya que debido a sus volatilidades, hay perdida durante la aplicación de vacío y durante la evaporación del eluato.

RESUMEN:

Los resultados del estudio indican que la extracción SPE seguida de la corrida del eluato por HPLC-DAD es efectiva en la deteccion de drogas en muestras de orina, sangre, plasma, contenido estomacal, viseras, pelos, uñas, alimentos, etc.
El procedimiento es rápido, fácil de realizar y consigue una excelente recuperación de todos los compuestos investigados incluyendo opiáceos, beta bloqueantes, fenotiacinas, benzodiacepinas, estimulantes y depresores,
Estas clases de drogas representa una porción de los compuestos frecuentemente encontrados en un screening de drogas e incluye compuestos frecuentemente encontrados en un screening de drogas e incluye compuestos que a menudo requieren procedimientos analíticos especiales tales como, morfina, benzoilecgonina, oxazepam, diazepam, bromazepam y otras benzodiacepinas.
El principio adsorción/elución de la SPE hace de esta la superior técnica de extracción por partición de amplio espectro en el screening de drogas.
La deteccion por PDA (DAD) ofrece a la técnica de HPLC un numero de ventajas previamente realizadas por GC/MS, dando información adicional en cada pico y haciendo de esta una técnica mas poderosa que cualquier método de GC capilar para screening de drogas.

-CONCLUSIONES

La Toxicología analítica ha presentado numerosos e importantes avances en la

segunda mitad del siglo XX, tanto en los procedimientos de aislamiento,

separación e identificación de sustancias tóxicas, como en los métodos de

confirmación y de cuantificación por técnicas de análisis instrumental.

Estos avances han permitido que se incremente notablemente la potencialidad de

detectar e identificar la presencia de pequeñísimas cantidades, del orden del

microgramo e incluso inferiores, en muy diferentes matrices biológicas de fluidos y

tejidos de origen humano y animal, o de trascendencia ecológica, tales como aire,

aguas, lodos, tierras o residuos sólidos y líquidos.

Desde muy diversos puntos de vista puede abordarse el ambicioso proyecto de

resumir estos avances, contemplando tanto su situación actual, como los

problemas que presentan y las tendencias, que a mas corto o breve plazo de

tiempo, se vislumbran, surgirán dando respuestas a dichas necesidades, o que

abrirán nuevas posibilidades en el análisis toxicológico.

He creído conveniente efectuar una visión panorámica de la situación actual de la

Toxicología analítica contemplando los diferentes métodos más actuales de

análisis cualitativos presuntivos, inmunoensayos, de extracción y aislamiento de

analitos y de las técnicas fisicoquímicas de análisis instrumental de más amplio y

generalizado uso en los laboratorios implicados en análisis toxicológico tales como

HPLC-DAD, HPLC-MS, GC-MS y Elecroforesis Capilar de alta resolución.

no hay que olvidar el importante tema de la garantía de calidad en los

resultados analíticos, en su más amplio contenido, contemplando la toma de

muestra, los problemas existentes en la denominada "cadena de custodia" de las

muestras y en la validación de los métodos analíticos de acuerdo con los criterios

estadísticos aplicables y exigidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

*-Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. Second edition. The pharmaceutical press - 1986.

- I. Ojanperä. Prologue special issue. *Forensic Science Int*. 121 (1-2) 1, 2001.

- M.J. Bogusz. New analytical technologies in forensic science-between novelty and reliability. *Proceedings TIAFT 2000 Helsinki*. Ed. By I. Rasanen pp. 1-10, 2001.

- R.A. de Zeew et al. Laboratory guidelines for toxicological analysis. *Bull The Int. Assoc. For. Toxicol.* 31 (4) 23-26, 2001

- L.A. Ferrari. Forensic Toxicology in Argentina. *Bull. The Int. Assoc. For. Toxicol.* 33 (1) 10-12, 2003

- S.D Ferrara. Drug-of-Abuse Testing in urine: Statistical Approach and experimntal Comparison of Inmunochemical and Chromatographic Techniques. *J. Anal.Toxicol.* 18: 278-91, 1994.

- L.A.Ferrari, et. Al. Aplicaciones de la espectrofotometría de absorción atómica al campo de la Toxicología y la Criminalística. *Rev. Fac. Ciencias Exactas et Nat. Univ. Morón*- 1, 25-36, 1996.-

- C. Staub, Supercritical Fluid extraction and hair análisis. *Forensic Sci. Int*. 84 , 295-304, 1997

- D.L.Allen and J.S.Oliver The use of supercritical fluidextraction for the determination of amphetamines in hair . *Forensic Sci. Int*. 107 , 191-199, 2000

- Drummer, O.Emerging trends in Forensic Toxicology. Proceeding 39th TIAFT Meeting Prague. Ed. By First Faculty of Medicine Charles University, pp.1-7 2.002

- Juthamas S, et al. Quantitative determination of Cocaine, Cocaethylene (Ethylcocaine), and Metabolites in plasma and urine by High-Performance Liquid *Chromatography. J. Ph.Sci*. 84:799-804, 1995.

*- Juthamas S, et al. Characterization of the Properties of Cocaine in blood: Blood clearance, Blood to Plasma Ratio, and Plasma Protein Binding. J.Ph.Sci. 85: 567-71

*-Glen P., et al. Automated screening procedure using gas chromatography-mass spectrometry for identification of drugs after their extraction from biological samples. *J Chrom.B.Appl*.565: 207-224. 1991.

*-Vandana D, et al. Solid-Phase Extraction of 11-nor-Delta 9 THCCOOH from human urine with gas chromatographic-mass spectrometric confirmation. J. Chrom.B. Appl.567: 81-91. 1991.

*- Joanne S et al. Solid-Phase Extraction of Drugs from Biological Tissues- A Review. *J Anal. Toxicol*. 16:264-69.1992.

*- Recommended methods for the detection and assay of heroin and cannabinoids in biological specimens. UNITED NATIONS. New York, ST/NAR/23 1993.

- Recommended methods for the detection and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, methamphetamine and ring-substitutedamphetamine derivates in biological specimens UNITED NATIONS. New Yor, ST/NAR/27 1995.

- Recommended methods for the detection and assay of cocacine, amphetamine, methamphetamine and ring-substituted amphetamine derivativos in biological specimems. UNITED NATIONS. New Yor, ST/NAR/24 1993.

- Eva M. Koves. Use of high-performance liquid chromatography-diode array detection in forensic toxicology. *journal of chromatography A* ,692 (1995) 103-119

-M.J.Bogusz. Hyphenated liquid chromatographic techniques in forensic toxicology. *Journal of chromatography* B,733(1999) 65-91.

-Hans H. Maurer. Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control. *Journal of chromatography* B (1999) 3-25.

-B.K.Logan, I.R.Tebbett, C.M.Moore. Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation exchange solid-phase extraction and HPLC-DAD.
Journal of analytical toxicology, vol 14 May/June 1990.

-R.J Flanagan,E.J. Harvey, E.P.Spencer. HPLC of basic drugs on microparticulate strong cation-exchange materials. *Forensic Science International* 121 (2001) 97-102.

-S.Abelaira, R. Laba,O. Quattrochi. Introduccion a la HPLC.