

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**DETERMINACIÓN SIMULTANEA DE THCA Y BENZOILECGONINA EN
ORINA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON ESPECTROMETRÍA DE
MASAS COMO BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A CANNABIS Y
COCAÍNA.**

JULIAN HERNEY PULIDO VARGAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

BOGOTÁ D.C.

2016

**DETERMINACIÓN SIMULTANEA DE THCA Y BENZOILECGONINA EN
ORINA POR CROMATOGRFÍA DE GASES CON ESPECTROMETRÍA DE
MASAS COMO BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A CANNABIS Y
COCAÍNA.**

JULIAN HERNEY PULIDO VARGAS

Tesis presentada como requisito para optar al título de
Magister en toxicología

Director:

JUAN SEBASTIAN SABOGAL CARMONA
Q.F, MSc TOXICOLOGÍA

Codirectores:

JAIRO ALFONSO TELLEZ MOSQUERA
M.D. MSc TOXICOLOGÍA

DIANA JAZMIN MARIÑO GAVIRIA
QUIMICA, MSc TOXICOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.

A mi madre y su cariño infinito.

A Pao, siempre con nosotros desde el cielo.

Agradecimientos

Al laboratorio de Toxicología de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia

Al hospital La Victoria sedes I y II por la autorización para la toma de muestras

A Diana Pava, Daniela Barreto y Carolina Yanguma por su apoyo en la toma de muestras

A todos los participantes del proyecto de extensión solidaria “programa de alertas tempranas y atención integral: en problemas de drogas... La nacho te escucha..... La nacho te apoya”.

Al departamento de Toxicología y el programa de la maestría en Toxicología y todos sus integrantes a lo largo de estos años.

Al Grupo de Investigación Sustancias Psicoactivas.

A mi director y codirectores por sus valiosos aportes y acompañamiento.

A toda mi familia, compañeros y amigos quienes de una u otra manera me apoyaron en el desarrollo de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido

TABLA DE CONTENIDO	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	IV
ANEXOS.....	IV
ABREVIATURAS	V
RESUMEN.....	VI
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 OBJETIVO GENERAL	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
3. MARCO CONCEPTUAL	7
3.1 CANNABIS.....	7
3.1.1 ABSORCIÓN.....	8
3.1.2 DISTRIBUCIÓN.....	9
3.1.3 BIOTRANSFORMACIÓN	10
3.1.4 ELIMINACIÓN	11
3.1.5 MECANISMO Y EFECTOS	11
3.2 COCAÍNA.....	12
3.2.1 ABSORCIÓN.....	12
3.2.2 DISTRIBUCIÓN.....	13
3.2.3 BIOTRANSFORMACIÓN	13
3.2.4 ELIMINACIÓN	14
3.2.5 MECANISMO Y EFECTOS	15
3.3 ANÁLISIS DE DROGAS EN ORINA- APLICACIONES	17
3.4 INTERFERENCIAS EN PRUEBAS RÁPIDAS.....	23
3.5 ESTABILIDAD DE LOS ANALÍTOS EN ORINA	24
3.6 CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	25
3.7 ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	29
3.8 ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	31
3.9 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	31
4. MATERIALES Y METODOS	35

4.1	TIPO DE ESTUDIO	35
4.2	INFRAESTRUCTURA	35
4.3	RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	36
4.4	EQUIPOS	36
4.5	REACTIVOS	37
4.6	MATERIAL DE LABORATORIO	37
4.7	MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO	37
4.8	PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES Y SOLUCIÓN AMORTIGUADORA	38
4.9	VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA	41
4.10	CONSIDERACIONES ÉTICAS	43
4.11	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS:	43
4.12	PARÁMETROS INSTRUMENTALES	46
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1	DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA	48
5.2	IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO	53
5.3	VALIDACION DE LA METODOLOGÍA ANALITICA	57
5.3.1	SELECTIVIDAD	58
5.3.2	LINEALIDAD Y RANGO	61
5.3.3	LIMITE DE DETECCIÓN	65
5.3.4	LIMITE DE CUANTIFICACIÓN	67
5.3.5	RECUPERACION	68
5.3.6	PRECISIÓN	69
5.4	ROBUSTEZ	72
5.5	ESTABILIDAD:	76
5.6	APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA	76
5.7	ANÁLISIS DE MUESTRAS PRELIMINARES POSITIVAS	78
6.	CONCLUSIONES	84
7.	RECOMENDACIONES	85
8.	BIBLIOGRAFIA	87
	ANEXOS	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Biotransformación del THC	10
Figura 2 Biotransformación de la cocaína.	14
Figura 3 Esquema de una trampa de iones.	30
Figura 4 Reacciones de derivatización para THCA y BE	46
Figura 5 Condiciones cromatográficas.	46
Figura 6 Condiciones del espectrómetro de masas.....	47
Figura 7. Frente del solvente.	53
Figura 8 Cromatograma y espectro de masas de BE.....	54
Figura 9 Cromatograma y espectro de masas BE-d3.....	55
Figura 10 Cromatograma y espectro de masas de THCA.....	55
Figura 11 Cromatograma y espectro de masas de THCA-d3.....	56
Figura 12 Fragmentación de BE.	57
Figura 13 Fragmentación de THCA.	57
Figura 14 Cromatograma y espectro de masas de interferente de la matriz.	59
Figura 15 Cromatograma y espectro de masas del blanco de reactivos.	60
Figura 16 Gráfico de linealidad para método de BE.....	62
Figura 17 Gráfico de linealidad para sistema de BE.	63
Figura 18 Gráfico de linealidad para método de THCA.	63
Figura 19 Gráfico de linealidad para sistema de THCA.....	63
Figura 20 Cromatograma y espectro de masas del LOD de THCA.....	66
Figura 21 Cromatograma y espectro de masas del LOD de BE.....	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Puntos de corte para determinación de drogas de abuso en orina por GC-MS.	18
Tabla 2 Ventana de detección de drogas de abuso en varias matrices biológicas.	19
Tabla 3 Material de referencia utilizado.	38
Tabla 4 Preparación de soluciones madre.	39
Tabla 5 Preparación de las soluciones de trabajo de los analítos.	39
Tabla 6 Preparación de las soluciones de trabajo de estándar interno.	40
Tabla 7 Preparación de los niveles de la curva de calibración.	40
Tabla 8 Concentración de estándar interno en las muestras.	41
Tabla 9 Tratamiento de las muestras.	44
Tabla 10 Idoneidad del sistema cromatográfico.	53
Tabla 11 Resumen de la validación de la metodología analítica.	58
Tabla 12 Resultados de selectividad.	61
Tabla 13 Resumen de linealidad de la metodología analítica.	64
Tabla 14 Resultados de recuperación para THCA.	68
Tabla 15 Resultados de recuperación para BE.	68
Tabla 16 Resultados de precisión para sistema de BE.	70
Tabla 17 Resultados para precisión del método de BE.	70
Tabla 18 Resultados de precisión para el sistema de THCA.	70
Tabla 19 Resultados de precisión para el método de THCA.	71
Tabla 20 Anova de precisión intermedia para BE.	71
Tabla 21 Anova de precisión intermedia para THCA.	72
Tabla 22 Diseño Placket Burman.	73
Tabla 23 Factores evaluados en robustez.	74
Tabla 24 Resultados de robustez.	74
Tabla 25 Análisis de resultados de robustez.	75
Tabla 26 Estabilidad de los analítos en las muestras.	76
Tabla 27 Resultados de las pruebas preliminares.	79
Tabla 28 Resultados de las pruebas confirmatorias.	82

ANEXOS

Anexo 1 Resultados curva de calibración 1 en método.	92
Anexo 2 Resultados curva de calibración 2 en método.	93
Anexo 3 Resultados curva de calibración 3 en método.	94
Anexo 4 Resultados curva de calibración 4 en método.	95
Anexo 5 Resultados curva de calibración 5 en método.	96
Anexo 6 Resultados curva de calibración en sistema.	97
Anexo 7 Secuencia para la confirmación de las muestras preliminares positivas.	98
Anexo 8 Acta de comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.	100
Anexo 9 Acta de comité de ética del hospital la Victoria.	101
Anexo 10 Inserto del inmunoensayo empleado.	105

ABREVIATURAS

THC: Delta 9 tetrahidrocannabinol.

THCA: 11 nor 9 carboxi delta 9 tetrahidrocannabinol.

BE: Benzoilecgonina.

GC: Cromatografía de gases.

MS: Espectrometría de masas.

ODC: Observatorio de drogas de Colombia.

SAMHSA: Substance Abuse and Mental Health Services Administration.

UNODC: United Nations Office on Drugs and Crime.

SOFT: Society of Forensic Toxicologists.

USP: United States Pharmacopeia.

BSTFA: N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide.

LOD: Limite de detección.

LOQ: Límite de cuantificación.

OEA: Organización de Estados Americanos.

AMA: Agencia mundial antidopaje.

FDA: U S Food and Drug Administration.

SWGTOX: Scientific Working Group for Forensic Toxicology.

RESUMEN

La cocaína y el cannabis son las drogas de abuso ilegales de mayor uso en Colombia como en el mundo; la determinación toxicológica de estas sustancias o sus metabolitos es una herramienta en la toma de decisiones en diferentes sectores de la sociedad. Por este motivo, se desarrolló, estandarizó y validó una metodología para la determinación simultánea de 11 nor 9 carboxi delta 9 tetrahidrocannabinol y benzoilecgonina en orina por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Esta metodología se aplicó para el análisis de muestras de orina obtenidas de 353 madres atendidas en el momento del parto en el hospital la victoria sedes I y II. Los resultados analíticos obtenidos evidencian la exposición reciente a cocaína en 10 casos 8 a cannabis.

Palabras clave: 11 nor 9 carboxi delta 9 tetrahidrocannabinol, benzoilecgonina, orina, cocaína, cannabis, cromatografía de gases, espectrometría de masas.

ABSTRACT

Cocaine and cannabis are two of the most abused drugs not only in Colombia but also worldwide; the toxicological determination of consumption of those substances or their metabolites can be used as a tool for decision making in several fields of society. For this purpose, an instrumental method for the simultaneous determination of 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol and benzoilecgonine in urine samples using gas chromatography coupled with mass spectrometry was developed, standardized and validated at the Toxicology Laboratory of the School Medicine of Universidad Nacional de Colombia.

Using this methodology, 353 urine samples from women in pregnancy who were under inpatient care at the La Victoria's Hospital (branches I and II) were analyzed. The analytical data obtained put in evidence a recent exposition to cocaine in 10 cases and cannabis in 8 cases.

Key words: 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol, benzoilecgonine, urine, gas chromatography, mass spectrometry, cocaine, cannabis.

1. INTRODUCCION

Actualmente se emplea el término “sustancia psicoactiva” con el fin de generalizar diferentes grupos de sustancias independientemente del origen, teniendo como factor común la capacidad para modificar las funciones psíquicas de un organismo vivo, y el término “Droga de abuso” para denominar a las sustancias que además de poseer una actividad psicoactiva, presentan un potencial adictivo y pueden sufrir manipulación química para su producción y uso. (Téllez Mosquera & Bedoya Chavarriaga, 2015)

El término droga ilegal se emplea con el fin de denominar sustancias psicoactivas cuya producción, venta o consumo están prohibidos en determinadas circunstancias bajo un marco normativo. (Babor, Campbell, Room, & Saunders, 1994)

A nivel orgánico se conoce que las diferentes drogas impactan y modifican sistemas y órganos, con unas consecuencias más severas en la población joven. (OEA, 2013c)

El inicio del consumo de drogas (legales o ilegales) y en algunos casos la dependencia que se genera involucran una fuerte interacción entre el cerebro y determinantes individuales como trastornos emocionales, problemas de aprendizaje, o la búsqueda de nuevas sensaciones; aspectos familiares, biológicos y psicológicos de cada individuo, los cuales se ven aumentados con aspectos sociales como exclusión, discriminación, falta de educación entre otros. (OEA, 2013c)

Dentro de los progresos relacionados con las drogas a nivel social es necesario mencionar que existe una mejor comprensión de los procesos de dependencia, en consumo de cocaína se ha reducido, se han desmantelado grandes organizaciones dedicadas al tráfico de drogas, se han ampliado los mecanismos de cooperación internacional, y se han reforzado las reformas judiciales de varios países. (OEA, 2013c)

Adicionalmente se asocia altos índices de violencia con países que son afectados por la producción, tránsito y tráfico de drogas ilegales, además de la

enorme estructura económica ilícita que es promovida por el negocio de las drogas, pues al encontrarse asociado a una prohibición se califica como ilegal y su práctica se considera un delito, lo cual también ha disparado el debate en las autoridades, debido a la aparición de estructuras de poder paralelas. (OEA, 2013c)

Existe un consenso internacional en dos planteamientos principales, el enfoque de salud pública, que reconoce la dependencia de drogas como una enfermedad crónica o recurrente, lo cual requiere una respuesta y tratamiento de salud pública. El segundo planteamiento establece la necesidad de promover el control de las drogas mediante una base científica y la inclusión de la sociedad en la definición de las políticas públicas. De esta manera se ha disminuido la tendencia a caracterizar al consumidor como objeto del sistema de justicia penal y se proveen alternativas a la privación de la libertad como respuesta a la identificación de consumo. (OEA, 2013c)

Esta preocupación aumenta debido a los costos económicos y sociales de las políticas y leyes para el control de las drogas, de tal manera que esta inversión puede llevar al detrimento del presupuesto para salud, educación y otros bienes sociales. (OEA, 2013c)

Sin embargo, se siguen presentando obstáculos para la atención de individuos que padecen trastornos relacionados con el consumo de estas sustancias, en los cuales se les dificulta o niega el derecho a la atención en salud, incluyendo el seguimiento y evaluación que garanticen el cumplimiento y éxito de terapias. (OEA, 2013c)

Existen otros factores que agravan las fragilidades hacia el uso problemático de drogas, que incluyen pero no se limitan a la presión para el aumento del consumo, la necesidad de rituales de tránsito y conexión; y la reafirmación de la exclusión. (OEA, 2013c)

Las políticas públicas incluyen la protección de las personas y las comunidades contra los daños relacionados con drogas, mitigación del daño a la salud de los consumidores, la reducción de las consecuencias negativas para los usuarios y

la prevención de problemas relacionados con el consumo de sustancias psicoactivas. (OEA, 2013b)

En Colombia se incluyó el concepto de dosis personal mediante la ley 30 de 1986, reiterado y despenalizado mediante la sentencia C-221 de 1994, tras la demanda de constitucionalidad presentada por Alexandre Sochandamandou. (Téllez Mosquera & Bedoya Chavarriaga, 2015)

De esta manera se define la dosis personal como: “La cantidad de estupefacientes que una persona porta o conserva para su propio consumo. Es dosis para uso personal la cantidad de marihuana que no exceda de veinte (20) gramos; la de marihuana hachís que no exceda de cinco (5) gramos; de cocaína o de cualquier sustancia a base de cocaína la que no exceda de un (1) gramo, y de metacualona la que no exceda de dos (2) gramos”. Adicionalmente establece que no es para uso personal si el estupefaciente tiene como fin la venta o distribución, sin importar la cantidad. (El Congreso de Colombia, 1986)

El principal argumento para soportar el porte y consumo radica en el derecho al libre desarrollo de la personalidad, sin embargo no se cuenta con soportes suficientes para establecer que las cantidades autorizadas no generan efectos adversos en el consumidor, por otra parte al no garantizarse mecanismos legales para obtener estas sustancias se impulsa la cadena del narcotráfico. (Téllez Mosquera & Bedoya Chavarriaga, 2015)

Estos límites de consumo personal tienen en cuenta el peso bruto de cada sustancia, lo cual genera un vacío de carácter técnico y científico, pues no todos los grupos de drogas poseen la misma concentración de los principios activos. (Téllez Mosquera & Bedoya Chavarriaga, 2015)

Por su parte el decreto 2467 del 22 de diciembre de 2015 tiene por objetivo la reglamentación del cultivo, autorización de posesión de semillas, procesos productivos, exportación, importación y uso del cannabis con uso estrictamente médico y científico; de tal manera que no puede ser usada con fines pedagógicos, profilácticos o terapéuticos para personas adictas, salvo que se autorice mediante una disposición legal. (Ministerio de Salud y Protección Social, 2015) Finalmente La Sala de Casación de la Corte Suprema de Justicia

en Sentencia de marzo de 2016 determinó que los consumidores de drogas o adictos a ellas no pueden ser encarcelados por el hecho de portar una dosis mayor a la que la ley establece como mínima.

De las personas en el mundo que se encuentran entre los 15 y los 64 años de edad, aproximadamente un 0,4% declaran haber consumido cocaína al menos una vez durante el 2013; la prevalencia de esta población en las américas alcanzo un 1,2%, equivalente a cerca de 7,4 millones de personas, cercano al porcentaje encontrado en la población europea. Para ese mismo año el uso de la cocaína se extendió bastante en la población escolar de 13 a 17 años de edad, alcanzando un 2% en el continente americano. (OEA, 2013a)

Se ha identificado que Colombia, Perú y Bolivia son los países que dan origen a toda la cocaína consumida en el mundo, mientras que el cannabis puede ser producido en casi todos los países del mundo, por tanto; no hay una única red de distribución o fuente geográfica. (OEA, 2013c)

El cannabis es la droga ilícita que presenta un mayor consumo en todo el mundo, se estima que entre el 2,6% y 5% de la población mundial entre 15 y 64 años consumió cannabis alguna vez durante el 2013, de esta manera los usuarios de cannabis llegan a representar cerca del 80% de los consumidores de drogas ilícitas a nivel mundial. Del total de consumidores de cannabis de las américas, el 81% son de América del Norte. (OEA, 2013a)

El cannabis es la droga ilícita de mayor consumo en el mundo, adicionalmente se ha identificado que uno de cada cuatro consumidores se encuentra en el continente americano. Merece especial atención debido a la creciente difusión recreacional y terapéutica, además de la tendencia a la despenalización. (OEA, 2013a)

Los datos obtenidos por el Observatorio de Drogas de Colombia en 2013 revelan que cerca del 13% de las personas ha usado alguna droga ilícita al menos una vez en la vida, durante este año el mayor consumo de drogas ilícitas se encuentra en la población de 18 a 24 años de edad con una tasa del 8,7%, seguidas por los adolescentes con un 4,8% y personas de 25 a 34 años

con un 4,3%. La diferencia entre estratos socio económicos no es estadísticamente significativa. (ODC, 2014)

En Colombia, el igual que en la mayoría de países del mundo el cannabis es la drogas de abuso más consumida, cerca del 11,5% de las personas menciona haber consumido esta sustancia al menos una vez en la vida y un 3,3% durante el 2012. De este último grupo el 57,6% muestra signos de abuso o dependencia, relacionados con uso problemático. (ODC, 2014)

Dentro de las sustancias ilícitas de mayor consumo, la cocaína ocupa el segundo lugar en Colombia, según el ODC para el 2013 cerca del 3,2% de la población Colombiana manifiesta haber consumido cocaína alguna vez en su vida y cerca del 0,7% declara haber usado cocaína al menos una vez en el último año, adicionalmente cerca del 1,2% reporta haber consumido bazuco alguna vez en su vida. (ODC, 2014)

Con el paso del tiempo se han modificado los patrones de consumo, por ejemplo, el consumo de cocaína ha disminuido en los Estados Unidos y ha aumentado en el cono sur, por su parte el consumo ilegal del cannabis ha presentado un aumento considerable, y existe una preocupación hacia el uso indebido de productos farmacéuticos legales. (OEA, 2013c)

Según la última encuesta nacional de consumo de drogas liderada por los Ministerios de Salud y Justicia el porcentaje de personas que consumieron por lo menos una vez en la vida sustancias ilícitas como cannabis, bazuco, éxtasis o heroína, pasó de 8,6% en el año 2008 a 12,17% en el 2013. (Observatorio de Drogas de Colombia, 2015). Además el 50% de la población Colombiana considera que el cannabis es fácil de conseguir. (ODC, 2014) En la población universitaria el consumo de cannabis alguna vez en la vida pasó del 11,21% en el 2009 a 15,01% en 2012. (ODC, 2015)

El gobierno Nacional promueve la formulación de una política integral de drogas con tres objetivos estratégicos, los cuales corresponden a: reducir el consumo de drogas a través de la implementación del “Plan Nacional de Promoción de la Salud, Prevención y Atención del Consumo de SPA 2014-2021”, disminuir las vulnerabilidades territoriales mediante una perspectiva de

desarrollo y desarticular las estructuras de criminalidad organizada dirigida a los eslabones intermedios y superiores de la cadena. (Observatorio de Drogas de Colombia, 2015)

Debido a la importancia que posee la determinación de consumo de estas drogas de abuso se emplea el análisis toxicológico con el fin de brindar información objetiva y de característica científica. El protocolo de pruebas típico se basa en una prueba preliminar (prueba de detección) usando los inmunoensayos en un modo semi-cuantitativo. Los resultados se designan como “positivo por confirmar” o negativo de acuerdo con los puntos de corte elegidos. Posteriormente los positivos se han de confirmar por una segunda técnica que emplee un principio químico diferente y ofrezca mayor especificidad con el fin de descartar falsos positivos. La cromatografía de gases con espectrometría de masas se considera el “Gold standard” de las técnicas confirmatorias. Se requiere además que la metodología analítica sea validada para demostrar objetivamente la aplicabilidad del método para la finalidad prevista. (Dasgupta, 2008)

Debido a que la exposición activa o consumo de drogas de abuso está relacionada con cambios en la percepción de la realidad, alteración en la toma de decisiones, cambio en los reflejos y en algunas instituciones se considera una actividad prohibida, se requiere de información objetiva que establezca la presencia o ausencia de los biomarcadores de exposición a estas drogas de abuso, pues el auto reporte o la acusación no suelen aportar información suficiente o veraz.

Es por ello que este trabajo brinda una herramienta de análisis para la identificación del consumo reciente a dos de las principales drogas de abuso a las autoridades competentes, centros de rehabilitación, apoyo al diagnóstico clínico, instituciones que requieran de la verificación de las condiciones óptimas de los empleados en su sitio de trabajo y procesos civiles.

En Colombia se cuenta con pocas metodologías analíticas que permitan a la comunidad general acceder a la confirmación de la exposición activa a estas drogas de abuso ilegales, lo cual constituye un vacío que promueve la investigación y desarrollo tecnológico. Los servicios de pruebas confirmatorias

para cada sustancia de manera individual y que cumplen con altos estándares de calidad existentes se ofrecen para apoyar la administración de la justicia y en control de dopaje; dejando en desprovisto de esta herramienta a diferentes sectores de la sociedad en donde su aplicación es de especial importancia. (Benavides & Jaramillo, 2011)

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar de manera simultánea el 11-nor-9-carboxi-delta 9-tetrahidrocannabinol (THCA), y benzoilecgonina (BE) en orina por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como biomarcadores de exposición a cannabis y cocaína.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar y Estandarizar una metodología analítica para el análisis simultaneo de THCA, y BE en orina por GC-MS.
- Validar una metodología analítica para la determinación simultanea de THCA y BE en orina como indicadores de consumo de cannabis y cocaína.
- Analizar THCA y BE en orina de voluntarios consumidores.

3. MARCO CONCEPTUAL

3.1 CANNABIS

El uso del cannabis se reporta hace más de 5000 años, difundándose desde Asia central. La composición del cannabis es muy compleja en su química, se han identificado más de 400 de sus componentes, en los que se incluyen terpenos, compuestos nitrogenados, esteroides, flavonoides, compuestos

nitrogenados, entre otros. La aparición de cannabinoides sintéticos y el descubrimiento de endocannabinoides o cannabinoides endógenos han impulsado el término “fitocannabinoides” para las sustancias provenientes de la *Cannabis sativa*. (Elsohly & Slade, 2005)

Su composición varía de acuerdo con las condiciones ambientales y genéticas de la planta. (Sabogal, 2015) Una dimensión que encaja entre la posesión y el suministro es el cultivo para el uso personal, responde a que se cultiva fácilmente en pequeñas cantidades. (OEA, 2013b)

La familia Cannabaceae es una pequeña familia de plantas con flores, incluye cerca de 170 especies agrupadas en 11 generos, incluido el cannabis; de este último género la especie sativa es la que más se ha correlacionado como psicoactivo. (Sabogal, 2015) El componente más conocido y al cual se le atribuye la principal actividad psicoactiva es el Delta 9 trans tetrahidrocannabinol o THC.

3.1.1 ABSORCIÓN

Por vía inhalatoria el THC se puede detectar en plasma tras unos pocos segundos, con un pico plasmático de 3 a 10 minutos tras el inicio del consumo. La biodisponibilidad oscila entre el 10% y 35%, varía de acuerdo a la periodicidad del consumo, profundidad de la inhalación, duración y sostenimiento de la respiración.

La absorción tras consumo oral es lenta y errática, los picos plasmáticos se observan después de 60-120 minutos, sin embargo en algunos estudios se reportan concentraciones plasmáticas máximas tras 4 horas del consumo. El THC es degradado por el pH del estómago e intestino, sin embargo su biodisponibilidad aumenta a cerca del 90% empleando diferentes vehículos oleosos.

Tras la administración vía oftálmica de THC en aceite mineral ligero, se observa una biodisponibilidad variable de 6-40% y una concentración

plasmática máxima tras una hora de la administración. (Minto, Schnider, & Shafer, 1997)

3.1.2 DISTRIBUCIÓN

El THC y sus metabolitos son altamente lipofílicos, con un coeficiente de reparto octanol/agua de aproximadamente 6000 y un pKa de 10,6. (Minto et al., 1997)

El volumen de distribución es de aproximadamente 10,6 L/kg. Se ha encontrado que el THC sigue un modelo de distribución multicompartmental. (Escobar Toledo et al. , 2009)

La distribución tisular del THC y sus metabolitos se rige por procesos físico-químicos, sin medios de transporte específicos. Cerca del 90% de THC de la sangre se distribuye en plasma, unido a proteínas plasmáticas. Su volumen de distribución aparente es de aproximadamente 3 litros.

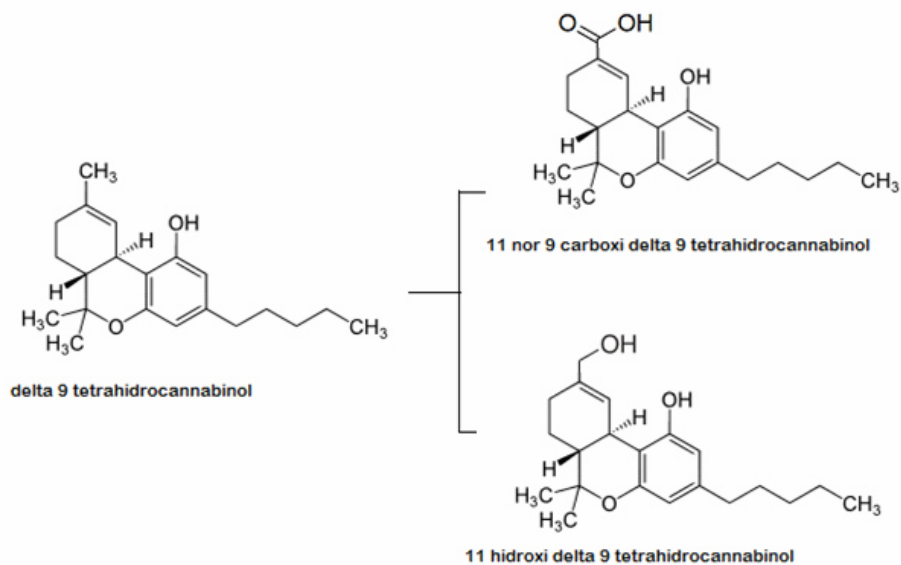
El elevado carácter lipofílico del THC lleva a una alta unión a tejidos, particularmente grasos, provocando un cambio de patrón de distribución en el tiempo. Penetra fácilmente en tejidos vascularizados como corazón, hígado, cerebro, glándulas mamarias, entre otros, lo cual conlleva una rápida disminución en la concentración plasmática, posteriormente se produce una acumulación intensiva en tejidos menos vascularizados y finalmente en grasa corporal con una relación grasa: plasma de hasta 104:1. Solo alrededor del 1% de THC administrado por vía intravenosa se encuentra en el cerebro en el momento del pico de psicoactividad. (Minto et al., 1997)

En seres humanos el THC penetra fácilmente la barrera placentaria, y se ha encontrado que las concentraciones plasmáticas fetales son solo levemente inferiores a las concentraciones plasmáticas maternas, sin embargo se ha encontrado que la concentración de THC en leche es 8,4 veces mayor que en plasma. (Minto et al., 1997)

El THC alcanza al cerebro en pocos minutos, y se reportan efectos subjetivos por el usuario aproximadamente 30 minutos tras el consumo. (Bosque, Fernández, Huesca, & Díaz, 2013)

3.1.3 BIOTRANSFORMACIÓN

Figura 1 Biotransformación del THC



Adaptada por los autores (Escobar 2009).

El metabolismo del THC es fundamentalmente hepático, por procesos de hidroxilación, glucuronidación y oxidación por las enzimas del sistema citocromo P450, particularmente de la subfamilia CYP2C. (Escobar Toledo et al., 2009)

Se han identificado cerca de 100 metabolitos del THC, la mayoría de los cuales corresponden a compuestos monohidroxilados. El principal metabolito activo es el 11-OH-THC. (Escobar Toledo et al., 2009)

Los principales metabolitos compuestos monohidroxilados, principalmente en el carbono 11, dando así origen al 11 hidroxilo THC y al 11 nor 9 Carboxi delta 9 tetrahidrocannabinol o THCA, el cual es glucuronizado en un porcentaje variable. (Minto et al., 1997)

3.1.4 ELIMINACIÓN

La vida media de eliminación del THC se encuentra entre 25 y 36 horas. (Escobar Toledo et al., 2009)

Cerca de 6 horas tras la administración intravenosa de THC se alcanza un pseudo equilibrio entre plasma y tejidos, la principal razón de la lenta eliminación del THC corresponde a la lenta redifusión del THC de la grasa corporal y otros tejidos a la sangre. (Minto et al., 1997)

La principal vía de eliminación es la urinaria, en periodos de tiempo que varían de acuerdo a la dosis consumida y a la periodicidad del consumo. La principal razón corresponde a la acumulación de THC en el organismo y la redistribución constante entre tejido adiposo y otros tejidos a la sangre. (Escobar Toledo et al., 2009)

3.1.5 MECANISMO Y EFECTOS

La mayoría de efectos se producen por acciones agonistas y antagonistas en receptores específicos, los receptores canabinoides y sus ligando endógenos se conocen como “sistema endocannabinoide”. Hasta el momento se conocen dos receptores de canabinoides, denominados CB1 y CB2, los cuales se encuentran acoplados a proteínas G. Los receptores CB1 se encuentran principalmente en neuronas del cerebro, medula espinal y sistema nervioso periférico, también en órganos como bazo, corazón, glándulas endocrinas, sistema reproductivo y gastrointestinal. Por su parte los receptores CB2 se encuentran en diferentes células del sistema inmunológico. (Minto et al., 1997)

El receptor CB1 se encuentra localizado en terminales glutaminérgicas, colinérgicas, noradrenergicas y GABAérgicas, y su principal función es reducir la probabilidad de liberación de estos transmisores. (Bosque et al., 2013)

La exposición crónica a canabinoides produce un fenómeno de desensibilización por una disminución del número de receptores CB1, los cual

parece estar relacionado con la aparición de tolerancia. (Escobar Toledo et al., 2009)

El cannabis es capaz de generar despersonalización, alucinaciones paranoia, pánico y psicosis; taquicardia, hipotensión, disminución en los reflejos, ataxia (Olson, 2006)

La dependencia a cannabis aparece en un 7 a 10% de los consumidores. (Olson, 2006)

3.2 COCAÍNA

La cocaína es el principal alcaloide de un arbusto originario de los Andes que pertenece a la especie *Erythroxylon*, el contenido del alcaloide varía según las regiones en las que se cultive y las diferentes variedades de la planta. Existen reportes del uso de sus hojas en épocas anteriores al año 1500 A.C., donde los Incas las masticaban para aumentar su resistencia física y la capacidad para realizar trabajos en grandes alturas. (Damin & Grau, 2015)

El clorhidrato de cocaína es la sal de la cocaína formada con ácido clorhídrico. Se presenta en forma de cristales escamosos blancos de composición irregular; se administra por vía intranasal (para esnifar) o se inyecta por vía venosa. Por su parte "Crack" o "rock" se obtiene al mezclar el clorhidrato de cocaína con amoníaco y el remanente en la producción de sales de cocaína se conoce como "basuco"; la forma de consumirla es inhalada o fumada mezclándola con tabaco, cannabis o fenciclidina. La cocaína base hace referencia al clorhidrato de cocaína mezclado con una solución básica. (Lizasoain, Moro, & Lorenzo, 2002)

3.2.1 ABSORCIÓN

La biodisponibilidad por vía intranasal es dosis dependiente y varía de 25 a 94%, mientras que los estudios muestran que por vía pulmonar (fumada) varía de 57 a 70%. Cuando se aplica en mucosas o ingerido sus propiedades

vasoconstrictoras disminuyen la velocidad de absorción y retrasan el tmax. (Rabelo, 2010)

La administración puede ser vía intranasal, fumada o inyectada vía intravenosa. Suele combinarse con otro tipo de drogas de abuso como la heroína, formando una mezcla de administración intravenosa y denominada speedball. (Sabogal, 2010)

A través del consumo vía inhalatoria se alcanza una concentración plasmática máxima tras 15 a 60 minutos, mismo tiempo en que inicia la producción del efecto eufórico; si el consumo es por vía oral se inician los efectos de 3 a 5 minutos tras el consumo, sin embargo el pico plasmático se encuentra de 50 a 90 minutos. Cuando es fumada la euforia se produce de 6 a 11 minutos. (Vargas, 2011)

La biodisponibilidad de la cocaína fumada puede variar del 10% al 20%. Al ser fumada la ecgonina se piroliza, formando compuestos químicos como la anhidroecgonina o ecgonidina. (Lizasoain et al., 2002)

3.2.2 DISTRIBUCIÓN

Ni la cocaína ni sus metabolitos se unen a proteínas plasmáticas. (Téllez & Cote, 2005). Su volumen de distribución es de aproximadamente 2,7 L/Kg. (Sabogal, 2010)

La cocaína después de ser administrada, es distribuida ampliamente por todo el organismo. (Lizasoain et al., 2002)

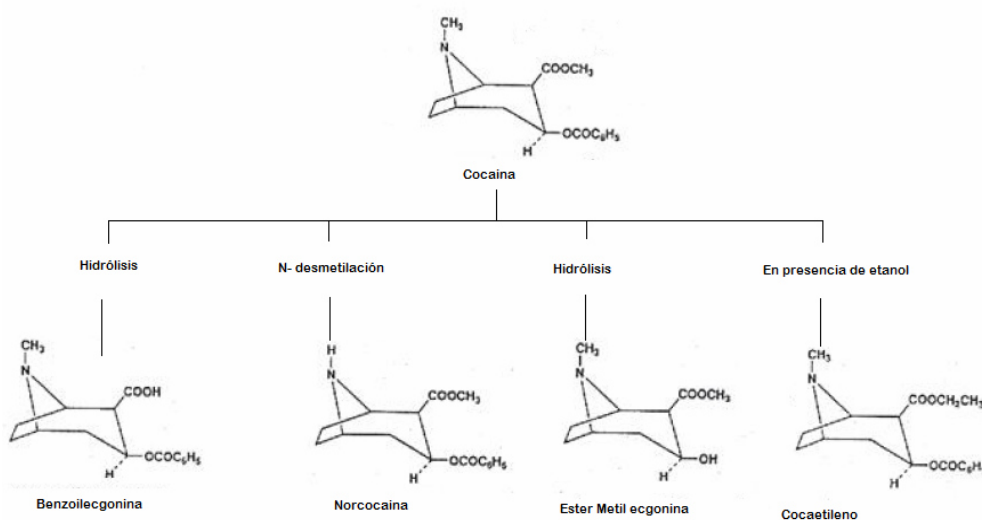
3.2.3 BIOTRANSFORMACIÓN

La cocaína se metaboliza rápidamente a través de hidrolisis no enzimática y enzimática, mediante esterasas plasmáticas, produciendo Benzoilecgonina, ecgonina metil ester y finalmente ecgonina. Puede eliminarse cocaína de manera inalterada por orina, pero solamente del 1% al 5%. Pueden generarse radicales como la norcocaína nitróxido, sin embargo debido a que sus cantidades no son significativas no genera alteraciones clínicas en humanos.

(Lizasoain et al., 2002) De 85-90% de la cocaína administrada es convertida a benzoilecgonina. (Karch, 2009)

El cocaetileno es un producto de biotransformación que se genera por transesterificación hepática de la cocaína en presencia de etanol. Debido a la actividad cardiotoxica y hepatotóxica de este metabolito, el riesgo de muerte súbita aumenta de 18 a 20 veces con relación a la cocaína. (Damin & Grau, 2015)

Figura 2 Biotransformación de la cocaína.



Adaptado por los autores (Sabogal 2010).

3.2.4 ELIMINACIÓN

Entre un 1% y 5% de la cocaína administrada se excreta de manera inalterada. El principal metabolito que se encuentra en la orina es la Benzoilecgonina, siendo posible su detección de 3 a 5 días tras el último consumo, dependiendo de la cantidad consumida, periodicidad del consumo, vía de administración y factores individuales. (Damin & Grau, 2015)

El aclaramiento de la cocaína varía de 20 a 30 mL/min/Kg; la vida media de la cocaína es de aproximadamente 60 minutos, sin embargo la vida media de la

Benzoilecgonina es de 6 a 8 horas y de la ecgonina metil ester de 3 a 8 horas. (Lizasoain et al., 2002)

3.2.5 MECANISMO Y EFECTOS

La cocaína es capaz de inhibir los procesos de recaptación de noradrenalina y dopamina, lo cual media la euforia; el consumo crónico de cocaína puede generar cambios en la disponibilidad de la dopamina; el exceso de noradrenalina produce la mayoría de efectos deseados así como de complicaciones agudas. (Téllez & Cote, 2005)

La cocaína también bloquea la recaptación de la serotonina, que junto con el cambio en la neurotransmisión catecolaminérgica constituyen el principal mecanismo de producción de dependencia. (Téllez & Cote, 2005)

Como muchos anestésicos locales, la cocaína genera una disminución de la permeabilidad de la membrana de los iones sodio, lo que produce un bloqueo en la conducción nerviosa. (Damin & Grau, 2015)

Debido a la toxicidad directa sobre el miocardio la dosis letal de cocaína por vía intravenosa en un adulto es de aproximadamente 1 gramo. La dosis letal por vía inhalatoria y oral se encuentra en un rango de 500 mg a 1500 mg, dependiendo de las condiciones de cada individuo. Se estima que cada línea de cocaína tiene de 15mg a 25 mg de cocaína; sin embargo, dependiendo de la pureza y la cantidad de la droga administrada puede alcanzar los 200 mg. (Vargas, 2011)

La cocaína es un agonista adrenérgico directo, lo cual se ve reflejado en el aumento del catabolismo energético. Por ser un agonista serotoninérgico la cocaína inhibe la recaptación de la serotonina y de su precursor el triptófano. (Téllez & Cote, 2005)

La cocaína puede generar un shock debido a infarto cerebral o del miocardio, este shock puede producir a su vez rhabdomiolisis y falla renal. El consumo crónico vía nasal puede producir lesiones en el tabique, la inyección de cocaína

puede generar úlceras localizadas, además de favorecer la aparición de infecciones. (Olson, 2006)

Las principales acciones de la cocaína se basan en la inhibición de la recaptación pre sináptica de noradrenalina, lo cual produce un efecto simpaticomimético responsable de la mayoría de las complicaciones tras el consumo de la cocaína, una estimulación de la liberación de dopamina, la cual disminuye la recaptación pre sináptica de dopamina y produce una estimulación del sistema nervioso central, un bloqueo en la reabsorción de serotonina que lleva a una reducción de las necesidades fisiológicas y del sueño y finalmente una disminución en la permeabilidad de las membranas a iones de sodio en tejidos neuronales, lo cual genera un efecto anestésico y es el responsable de la depresión del sistema nervioso central. (Damin & Grau, 2015)

A partir de estos mecanismos se producen los efectos deseados tales como un aumento en la energía, disminución de la necesidad de comer, dormir o tomar líquidos, hipervigilancia, mayor conciencia sensorial y autoconfianza, autoestima y megalomanía sin alucinaciones ni confusión cognitiva. (Damin & Grau, 2015)

Sin embargo al desaparecer los efectos deseados, usualmente el consumidor entra en un estado de resaca, caracterizado por inquietud, malestar general y decaimiento. (Damin & Grau, 2015)

Los daños que puede producir la cocaína como consecuencia de un vaso espasmo se pueden ver reflejados en casi todos los órganos, además de las alteraciones en la coagulación y hemorragias vasculares. Los efectos cardiovasculares dependen de la dosis; mientras bajas dosis pueden producir bradicardia por estimulación vagal, a mayores dosis se producen taquicardia, hipertensión arterial, isquemia miocárdica, palpitaciones, arritmias auriculares, ventriculares e infarto de miocardio. (Damin & Grau, 2015)

El consumo simultáneo de cocaína y alcohol produce coca etileno, el cual no solo posee mayor toxicidad a nivel cardio vascular sino que potencia el daño arritmogénico y la probabilidad de sufrir muerte súbita. (Damin & Grau, 2015)

La euforia producida se caracteriza por cuatro etapas, que inicia en la excitación placentera con hiperactividad, excitación sexual y taquicardia, seguidos de disforia, la cual se caracteriza por la apatía, agresividad, melancolía y deseo de consumir más cocaína; posteriormente se pueden producir alucinaciones, apatía sexual y tendencia a huir. Finalmente se produce psicosis, que puede venir días e incluso meses tras consumir la droga. (Vargas, 2011)

Los efectos se presentan en múltiples sistemas, a nivel gastrointestinal se producen desde colitis intensas y aparición de úlceras peptídicas hasta fuerte intestinal, en el aparato respiratorio puede producir taquipnea y en el caso del crack fumado, edema agudo de pulmón. Genera un aumento en la temperatura corporal a partir de una vasoconstricción periférica y el desacople de los centros reguladores. (Vargas, 2011)

En mujeres en estado de embarazo el consumo de cocaína está asociado con muerte fetal y elevado riesgo de aborto, adicionalmente el neonato suele poseer menor peso y perímetro cefálico; debido a que la cocaína atraviesa fácilmente placenta, puede producir lesiones cerebrales en el feto. Los efectos en el lactante aún son desconocidos. (Vargas, 2011)

3.3 ANÁLISIS DE DROGAS EN ORINA- APLICACIONES

El término análisis de drogas en matrices biológicas permite determinar un grupo de sustancias o una sustancia específica cuando se encuentre presente en concentraciones superiores al punto de corte específico.

El cut off o punto de corte para una sustancia hace referencia a la concentración sobre la cual se considera un resultado positivo (SAMHSA, 2012)

Tabla 1 Puntos de corte para determinación de drogas de abuso en orina por GC-MS.

Sustancia	Análisis preliminar	Punto de corte preliminar (µg/mL)	Analito para confirmación	Punto de corte confirmatorio (µg/mL)
Cannabis	Metabolitos de Marihuana	0,050	THCA	0,015
Cocaína	Metabolitos de Cocaína	0,150	Benzoilecgonina	0,100

Adaptado por los autores (SAMHSA 2008).

Debido a las consecuencias que puede acarrear para el consumidor de sustancias ilícitas, se requiere la confirmación inequívoca del analito de interés, además de poder diferenciarlo de una exposición pasiva. (SAMHSA, 2012)

La ventana de detección para una sustancia hace referencia al tiempo en que una sustancia o sus metabolitos pueden ser detectados en una matriz, lo cual depende de las propiedades químicas de la sustancia, procesos de absorción, distribución, metabolismo y vías de eliminación, sensibilidad de la metodología específica, punto de corte establecido y la matriz en sí misma. (SAMHSA, 2012)

Diversos factores pueden influenciar la ventana de detección de una sustancia, tales como la frecuencia de consumo, las cantidades administradas, tasas individuales de metabolismo, contenido de grasa corporal y condición física del paciente, pues en algunos casos patologías renales o endocrinas pueden extender la ventana de detección. (SAMHSA, 2012)

Tabla 2 Ventana de detección de drogas de abuso en varias matrices biológicas.

Matriz	Tiempo					
	Minutos	Horas	Días	Semanas	Meses	Años
Aliento	██████████					
Sangre	██████████					
Saliva	██████████████████					
Orina	██████	██				
Sudor		██████████				
Cabello			██████	██		
Meconio				██████████████████		

Adaptado por los autores (SAMHSA 2012).

Tradicionalmente el análisis de drogas incluye un proceso de dos etapas, un screening, cribado o tamizaje inicial que indica la presencia o ausencia de una sustancia o sus metabolitos, seguido de un análisis confirmatorio de los resultados positivos.

El término de screening en drogas de abuso generalmente hace referencia al uso de inmunoensayos para la determinación preliminar de la presencia de alguna droga de interés.

En el screening se identifica la presencia o ausencia de una sustancia o sus metabolitos, sin embargo puede indicar la presencia de reactividad cruzada con sustancias con estructuras químicas similares; sin embargo, su uso es económico, sencillo, automatizado y produce resultados en un corto intervalo de tiempo. (SAMHSA, 2012)

La mayoría de pruebas preliminares se basa en las interacciones antígeno-anticuerpo, empleando enzimas, micropartículas o compuestos fluorescentes como marcadores. (SAMHSA, 2012)

Las pruebas preliminares están diseñadas para generar resultados positivos o negativos, de esta manera cuatro resultados son posibles (SAMHSA, 2012)

- Verdadero positivo cuando la prueba detecta la presencia de la droga o sus metabolitos.

- Falso positivo cuando la prueba genera un resultado positivo en ausencia de la droga o sus metabolitos.
- Verdadero negativo cuando la prueba genera un resultado negativo positivo en ausencia de la droga o sus metabolitos.
- Falso negativo cuando la prueba genera un resultado negativo en presencia de la droga o sus metabolitos.

La reactividad cruzada ocurre cuando la prueba no puede distinguir entre la sustancia que se está buscando y otros compuestos con estructuras químicas similares. Generalmente las pruebas preliminares son específicas para un análisis con el cual se calibra, de tal manera que la reactividad cruzada depende de la relación de las sustancias con el anticuerpo del instrumento. Las sustancias que generan esta reactividad cruzada son las responsables de la mayoría de los falsos positivos. (SAMHSA, 2012)

No existe una regulación que establezca de manera específica los anticuerpos que se emplean en el desarrollo de inmunoensayos, sin embargo los puntos de corte requeridos se encuentran bien definidos para cada una de las sustancias o grupos de sustancias. De la misma manera han sido publicados diferentes metodologías para análisis confirmatorio en diferentes matrices, tanto biológicas como no biológicas, sin embargo se han establecido los parámetros de desempeño que deben cumplir para el desarrollo y aplicación adecuados. La tecnología más empleada para el desarrollo de las pruebas confirmatorias involucra cromatografía de gases o líquida, acoplada a espectrómetros de masas, los cuales pueden o no estar configurados en tándem. (Negruz & Cooper, 2015)

El análisis confirmatorio permite verificar o refutar el resultado de un preliminar positivo, con una alta especificidad, sensibilidad y la posibilidad de tener resultados cuantitativos, facilitando así la individualización de los análisis. (SAMHSA, 2012)

La técnica analítica empleada para el análisis confirmatorio se debe basar en un principio químico diferente. (SOFT & AAFS, 2006)

En situaciones clínicas no siempre es necesario el análisis confirmatorio, pues una correlación con las manifestaciones del paciente es suficiente o cuando el mismo paciente manifiesta el consumo de la sustancia. (SAMHSA, 2012)

La orina es el fluido biológico preferido pues es la principal ruta de eliminación de una amplia gama de sustancias, su recolección es no invasiva y generalmente se obtiene en cantidades suficientes, adicionalmente los análisis involucran menos costos en cuanto a tratamiento e instrumentación, existe una amplia variedad de pruebas rápidas y se tiene un amplia experiencia en el manejo de la matriz. Permite la determinación de consumo reciente de drogas, la ventana de detección de cada una de ellas depende de la forma de consumo y su cinética propia. (SAMHSA, 2012)

La orina es un espécimen de amplia aplicación tanto en casos antemortem como posmortem, sin embargo la multiplicidad de factores que influyen la concentración de los analitos en la orina, tales como el volumen de orina, el aclaramiento, metabolismo, cantidad consumida, tiempo tras la exposición y factores individuales, la aplicación suele limitarse a la identificación cualitativa, con algunas excepciones tales como el etanol y el GHB. En casos específicos como el control al dopaje, la cuantificación de sustancias endógenas o exógenas que no deben sobrepasar una concentración umbral, también denominado límite de decisión. (AMA, 2015)

Sin embargo, la orina es una matriz fácilmente manipulable, por ende es necesario tener en cuenta una serie de parámetros que permita identificar adulteración de la muestra.

Se considera que una muestra de orina está adulterada cuando contiene una sustancia que no se encuentra de manera natural en la orina, o que se encuentra normalmente pero en concentraciones anormales.

La sustitución de una muestra de orina se puede presentar cuando el proceso de recolección no es vigilado. Usualmente se sustituye por orina de otra persona, sin embargo puede ser cambiada por agua o solución salina. Otra

forma de manipulación de la orina consiste en la dilución hasta el punto en que el analíto de interés se presenta en una concentración inferior al punto de corte (SAMHSA, 2012) (SAMHSA, 2008)

Para definir una muestra de orina como adulterada se requiere identificar uno de los siguientes factores (SAMHSA, 2008):

- pH inferior a 3 o superior a 11
- Concentración de nitritos igual o superior a 500 µg/mL
- Presencia de cromo en la muestra, empleado como agente oxidante
- Presencia de halógenos
- Presencia de glutaraldehido
- Presencia de piridina
- Identificación de agentes surfactantes
- Baja temperatura de la orina en el momento de la toma de muestra
- Si presenta características físicas anormales, incluida partículas de semisólidos

Una de los métodos que se emplea para evitar la adulteración de la muestra implica el acompañamiento y observación durante la recolección de la orina, en este caso el observador debe ser del mismo género del individuo implicado, no se deben emplear cámaras fotográficas o de video y se debe contar con la autorización expresa del individuo, este tipo de recolección de muestra se ha denominado "intrusivo". (SAMHSA, 2012)

Con el fin de preservar las condiciones de los analítos y prevenir la degradación tras la toma de la muestra, se recomienda el almacenamiento de las muestras bajo refrigeración a 4°C, en caso de que se pretendan almacenar por tiempo superior a dos semanas, se recomienda mantener bajo congelación a una temperatura aproximada de -20°C, con excepción de muestras como el cabello, uñas, filtros de papel e incluso algunas no biológicas que preservan las condiciones iniciales por un largo periodo de tiempo. (Negrusz & Cooper, 2015)

3.4 INTERFERENCIAS EN PRUEBAS RÁPIDAS

Dado que el desempeño de los inmunoensayos se encuentra determinado por su inmutabilidad y especificidad, pueden presentarse reacciones de reactividad cruzada debido a la presencia de sustancias endógenas o exógenas, legales o ilegales estructuralmente similares. En el caso de las pruebas confirmatorias, como suelen desarrollarse mediante espectrometría de masas y bajo unos parámetros de desempeño definidos, se obtiene la individualización e identificación inequívoca de los analitos de interés. (Dasgupta, 2008)

En el caso de inmunoensayos que emplean técnicas de absorbancia, la presencia de glutaraldehído puede enmascarar la presencia de cannabinoides, metabolitos de la cocaína, opiáceos, anfetaminas y Fenciclidina. La presencia de nitrito de sodio o potasio puede enmascarar la presencia de cannabis, es por ello que se suele realizar el análisis de nitritos para verificar la autenticidad de la muestra, la presencia de agentes altamente oxidantes conlleva a la rápida degradación de diferentes analitos en orina. (SAMHSA, 2012)

En casos de cocaína y cannabis la presencia de falsos positivos es muy escasa para cocaína y sus metabolitos, sin embargo la presencia de artefactos, de compuestos similares al analito de interés y la incorrecta interpretación del test inicial son factores que pueden llevar a un falso positivo. (SAMHSA, 2012)

Dentro de las sustancias químicamente similares se encuentran algunos medicamentos que son tomados de manera legal, de ahí la importancia de encuestar al individuo a quien se le realiza el análisis. Para cannabis en los inmunoensayos ha sido reportada reactividad cruzada por fármacos como prometazina, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, diflunisal, indometacina, ketoprofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, meclofenamato, nabumetona, oxaprozin, piroxicam, sulindac, tolmetin y algunos cannabinoides sintéticos como el dronabinol. (Sabogal & Pulido, 2015)

La exposición pasiva ha sido una excusa recurrente presentada por varios individuos tras un resultado positivo en el análisis de drogas de abuso, sin embargo diferentes estudios han demostrado que la exposición pasiva a

compuestos como el cannabis llevan a concentraciones urinarias inferiores a los puntos de corte, de tal manera que para que la exposición pasiva conlleve a un resultado positivo se requieren de condiciones extremas en cuanto a tiempo de exposición, bajos niveles de ventilación y altas concentraciones de las drogas en el ambiente, los cuales no son escenarios que se presenten en modelos distintos a estudios controlados. (Negrusz & Cooper, 2015)

3.5 ESTABILIDAD DE LOS ANALÍTOS EN ORINA

La orina ofrece una ventana de detección más prolongada que la sangre para el análisis de consumo de sustancias psicoactivas que poseen excreción renal, estos especímenes deben refrigerarse lo antes posible. (UNODC, 2013)

De manera general los analítos de interés pueden descomponerse al encontrarse en un fluido biológico durante el almacenamiento y la conservación, lo cual puede llevar a falsos negativos al momento del análisis, de ahí la importancia de conservar las muestras de origen biológico de manera idónea para mantener por el tiempo requerido el estado inicial de los analítos. (Morales, DiBernadro, Luna, & Garcia, 2003)

Hippenstiel y Gerson establecen que las condiciones óptimas de almacenamiento requieren de una temperatura aproximada de -15°C sin necesidad de ajuste de pH, de manera independiente del material del contenedor para la cocaína, ofreciendo una estabilidad de aproximadamente 110 días sin pérdidas significativas y de 9 meses para la BE. La cocaína es hidrolizada de manera espontánea en muestras de orina, plasma y sangre únicamente a benzoilecgonina. (Hippenstiel, Gerson, St, & St, 1994)

Por otra parte es posible que la radiación genere des metilación de la cocaína produciendo así norcocaína, sin embargo la BE no se ve afectada por este proceso. (Hippenstiel et al., 1994)

Gonzales y colaboradores refieren que a una temperatura de -20°C por 6 meses se generan pérdidas de no más del 14% y para Benzoilecgonina pérdidas inferiores al 10%. (Gonzales et al., 2013)

Desrosiers y colaboradores enuncian que para el almacenamiento de muestras que contengan THCA se recomienda emplear contenedores de polipropileno debido a que posee menos propiedades adsorptivas que el vidrio. (Desrosiers, Lee, & Scheidweiler, 2014)

Skopp y Pötsch describen que con el paso del tiempo y dependiendo de las condiciones de almacenamiento de las muestras, la concentración del THCA en su forma de glucuronido disminuye, lo cual conlleva a un aumento en la concentración del THCA libre, el cual posteriormente es degradado. Por ejemplo, en muestras almacenadas a temperaturas de -4 a 20°C , la pérdida del THCA conjugado llega a ser del 25%, mientras el aumento del THCA libre llega a superar el 99% de la concentración inicial. También indican que la liberación del THCA de su conjugado es dependiente del pH a diferencia de la degradación del THCA. (Skopp & Pötsch, 2004)

Las concentraciones de THCA aumentan significativamente tras 6 meses de almacenamiento a -20°C , debido a un decrecimiento del THCA conjugado, de esta manera si se requiere de una cuantificación es necesario realizar los análisis en un periodo inferior a 6 meses. (Desrosiers et al., 2014)

3.6 CROMATOGRAFÍA DE GASES

El concepto de separación de una muestra mediante una columna fue desarrollado en 1903 por Mikhail Tswett, introduciendo desde ese momento el concepto de cromatografía; en un sistema cromatográfico se emplea un pequeño volumen de muestra en la fase estacionaria, posteriormente la fase móvil transporta los componentes de la muestra en contacto con la fase estacionaria, donde por diferentes mecanismos de afinidad se produce la separación de los componentes. (Lundanes, Reubsaet, & Greibrokk, 2013)

Dadas las diferentes interacciones entre la fase estacionaria y los componentes de la muestra, estos migran a través del sistema con diferentes velocidades y

eluyen en diferentes tiempos de retención, entendiéndose como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la salida de la columna y es específico para cada analíto. Si un componente migra sobre la fase estacionaria sin interacción alguna, a su tiempo de elución se le conoce como tiempo muerto.

En cromatografía de gases la fase móvil corresponde a un gas, de tal manera que los analítos requieren contar con suficiente volatilidad para desplazarse por la columna; este gas debe ser inerte y de alta pureza, de tal manera que no reaccione con componentes de la muestra ni de la fase estacionaria. (Lundanes et al., 2013)

El nitrógeno suele emplearse como fase móvil debido al bajo costo, sin embargo el uso de helio o hidrógeno permite un aumento de los platos teóricos en relación con el flujo del gas, lo cual favorece el tiempo de análisis y la eficiencia cromatográfica. (Lundanes et al., 2013)

El mecanismo de separación en cromatografía de gases depende del tipo de agregación de la fase estacionaria: en cromatografía gas- líquido ocurre una partición del analíto entre la fase móvil y la fase estacionaria, mientras que en cromatografía gas- sólido ocurre una adsorción competitiva de los analítos por los sitios activos de la superficie de la columna. (Stashenko & Martínez, 2010)

La columna cromatográfica se encuentra localizada en un horno, el cual provee al sistema de control sobre las temperaturas y al ser ajustado de manera adecuada favorece la separación.

La muestra es introducida en la columna mediante un sistema de inyección. En la entrada de la columna se ubica el glass liner, que se soporta sobre una placa metálica con control de temperaturas, empleando una temperatura más alta que la de la columna con el fin de permitir la rápida evaporación de la muestra desde el momento que es introducida; de tal manera que se requiere una septa al inicio de todo el sistema que impida la salida de la muestra en estado gaseoso tras la volatilización. (Lundanes et al., 2013)

Tres tipos de columnas tubulares abiertas suelen emplearse en cromatografía de gases: WCOT (wall-coated open tubular), PLOT (porous-layer open tubular) y SCOT (support-coated open tubular).

Debido a que para realizar la inyección de compuestos en un sistema de cromatografía de gases se requiere una elevada temperatura, los compuestos termo lábiles y/o no volátiles no pueden separarse mediante esta técnica, sin embargo a través de un proceso denominado derivatización se pueden obtener derivados volatilizables y estables a temperaturas elevadas.

Existen varios tipos de derivatización para cromatografía de gases, los más empleados son: sililación, acilación y alquilación, de entre los cuales la Sililación se conoce como el método de derivatización universal, pues puede afectar casi todas las moléculas polares con grupos funcionales protónicos generando derivados del trimetil silil (TMS).

La acilación puede llevarse a cabo mediante el uso de anhídridos o agentes ácido clorados, principalmente el anhídrido trifluoro acético, anhídrido penta fluoro propionico, anhídrido hepta fluorobutirico y sus correspondientes ácidos. En esta reacción el hidrógeno de la mayoría de grupos polares, con excepción de los ácidos es asilado.

En la alquilación se produce una reacción en la cual un hidrógeno activo se reemplaza por un grupo alquil, por ejemplo un metilo, empleando alquil halógenos o diazo alcanos. (Lundanes et al., 2013)

En algunos casos el proceso de derivatización permite aumentar la masa del compuesto para distinguir sus iones del ruido de fondo. (Bertholf & Winecker, 2007)

Durante el proceso de migración del analito por el sistema cromatográfico, existe una distribución de las moléculas sobre la fase estacionaria y la fase móvil, lo cual se conoce como factor de retención, donde se entiende que si el número de moléculas en la fase estacionaria es más alto que en la fase móvil, la separación requerirá de más tiempo y viceversa. (Lundanes et al., 2013)

La cromatografía de gases es una técnica analítica empleada para separar compuestos orgánicos volátiles presentes en una muestra. (Groves & Dean, 2013)

La primera descripción de cromatografía de gases fue presentada en 1952 por James and Martin. (Groves & Dean, 2013)

Las impurezas presentes en el gas de arrastre pueden generar picos inesperados, deteriorar los picos obtenidos y disminuir el tiempo de vida útil de los equipos; las principales impurezas corresponden a oxígeno y agua, por tanto además de emplear gases de alta pureza se recomienda el uso de filtros entre la fuente del gas y su llegada al sistema para que puedan ayudar a eliminar estas impurezas. (Groves & Dean, 2013)

Existen dos formas en las que se puede realizar la inyección mediante la cámara del liner, ya sea splitless (sin división) donde toda la muestra introducida en el sistema pasa a la columna, o Split (con división), donde mediante el ajuste de válvulas o flujos se genera una relación de la muestra, donde una porción determinada alcanza la columna cromatográfica y la otra porción es llevada a los desechos. (Groves & Dean, 2013)

Es esencial controlar las temperaturas con el fin de obtener resultados reproducibles, particularmente la temperatura del horno, el cual debe poseer la capacidad de operar en gradientes o a través de isotermas, según el método cromatográfico lo requiera. (Groves & Dean, 2013)

En columnas capilares WCOT (Wall coated open tubular column) empleadas para cromatografía de gases se emplean principalmente dos tipos de fase estacionaria: polímeros tipo siloxano sustituidos, los cuales dependen de los sustituyentes y el porcentaje ofrecen un amplio rango de polaridades y polietilenglicoles los cuales son altamente polares. La capacidad de análisis que se puede albergar en una fase estacionaria se incrementa con la afinidad a esta última. (Stashenko & Martínez, 2010)

3.7 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Los inicios de la espectrometría de masas se remontan a Sir J.J. Thomson, quien desarrollo el primer espectrómetro de masas buscando medir las masas y cargas de los rayos catódicos, logro por el cual recibió un premio nobel de física en 1906. (Wanner & Hofner, 2015)

En la actualidad la espectrometría de masas corresponde a una técnica analítica de alta sensibilidad que permite identificar y cuantificar diferentes analítos, midiendo de manera precisa la abundancia de estas moléculas luego de ser convertidas en iones, caracterizándolas por su relación de masa y carga. (Wanner & Hofner, 2015)

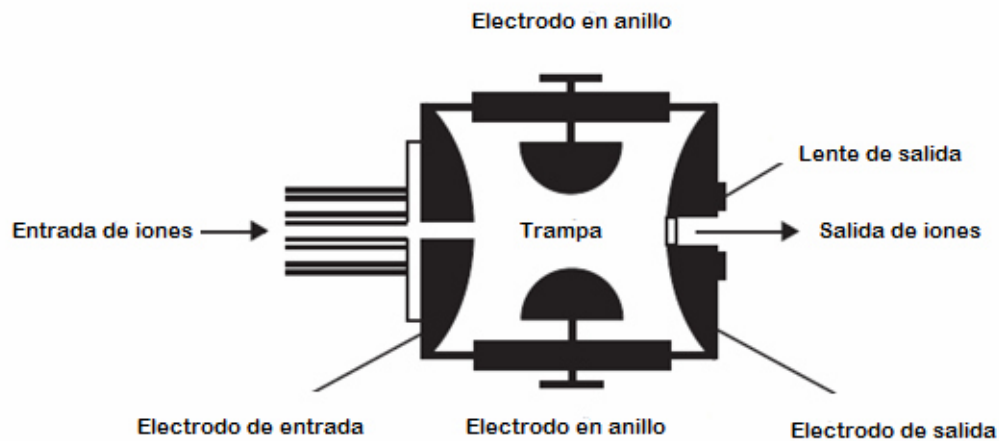
De acuerdo a su forma de operación los espectrómetros de masas pueden agruparse en tres categorías: de modo continuo, como es el caso de cuadrupolos, de modo pulsado para los detectores de tiempo de vuelo y en modo de trampa de iones. (Wanner & Hofner, 2015)

En espectrometría de masas se siguen las siguientes etapas: atomización, conversión de las moléculas en iones, separación de los iones formados según su relación masa/carga y finalmente un recuento de los iones formados o la corriente iónica al incidir en un detector adecuado. (Skoog & Holler, 1992)

En el caso particular de la trampa de iones, el sistema consiste en un juego de tres electrodos hiperbólicos: un anillo central, un electrodo de entrada y uno de salida. La energía de los iones en la trampa se obtiene a partir del helio. (Flanagan & Taylor, 2007)

En la trampa, la energía centrífuga de los iones formados es reducida por el helio a una presión de 133 Pa y por lo tanto son centrados dentro de la trampa. (Flanagan & Taylor, 2007)

Figura 3 Esquema de una trampa de iones.



Adaptado por los autores (Flanagan & Taylor, 2007)

Con el fin de detectar los iones los potenciales son alterados gradualmente, de tal manera que su movimiento se desestabiliza, resultando en la expulsión de los iones a través del electrodo que se encuentra en la salida. Estos iones se expulsan generalmente en un orden creciente según su relación masa/carga, generando una corriente de iones sobre el detector y de esta manera producir un espectro de masas.

El vacío que se requiere en un sistema de trampa de iones no es tan elevado como el necesario en un sistema de cuadrupolos o tiempos de vuelo, debido a que las distancias en que se desplazan los iones son cortas, sin embargo, esto mismo puede aumentar la probabilidad de interacción entre iones dentro de la trampa. (Flanagan & Taylor, 2007)

El propósito de los detectores en cromatografía es generar una señal correspondiente a los analitos que han eluido a través de la columna en función de una propiedad en particular; para ello deben cumplir con una serie de características tales como una baja señal de ruido, la cual hace referencia a cualquier perturbación del detector que no está relacionada con el compuesto de interés. Una alta sensibilidad, la cual consiste en un cambio en la señal del detector como resultado de un cambio en la concentración del analito dentro de

un rango dinámico y una elevada selectividad, haciendo referencia a cambios de respuesta para átomos específicos. (Groves & Dean, 2013)

3.8 ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA

El desarrollo y optimización de los parámetros de procesamiento de los datos e instrumentos se realizan mediante el material de referencia correspondiente al análisis de interés con el objetivo de lograr el rendimiento requerido. Por su parte la preparación de la muestra se debe desarrollar con matrices enriquecidas con el material de referencia, con el fin de demostrar que los procesos de extracción permiten la determinación de los análisis de interés. (SWGTOX, 2013)

El material de referencia corresponde a una sustancia en la que se conoce que una o más de sus propiedades están suficientemente establecidas, empleada para la calibración de equipos, evaluación de una medida o asignar valores a otros materiales. (SOFT & AAFS, 2006)

El aseguramiento de calidad requiere que los procedimientos del laboratorio se encuentren documentados de manera sistemática y revisados por un ente externo con el fin de optimizar la eficiencia de los resultados (Bertholf & Winecker, 2007)

El estándar interno debe poseer propiedades físicas y químicas tan similares al análisis como sea posible, el ideal para métodos cromatográficos que empleen espectrometría de masas es el uso de isótopos estables, como lo son los análisis deuterados. (SOFT & AAFS, 2006)

Una vez estandarizado un método de trabajo, este debe ser optimizado y validado con el fin de garantizar que cumpla los fines para los cuales se ha desarrollado y así emplearlo de modo rutinario. (Bertholf & Winecker, 2007)

3.9 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Según la norma técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025 la validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que

se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. (NTC-ISO-17025, 2005) En la actualidad la validación de un método analítico se ha posicionado como uno de los estándares de calidad más relevantes en el momento de la realización de análisis rutinarios.

La validación de una metodología analítica es entonces el proceso de realización de una serie de experimentos, que permiten estimar la eficacia y fiabilidad de un método analítico, además de identificar las limitaciones en condiciones de funcionamiento normal. (SWGTOX, 2013)

En la práctica se desarrollan tres tipos de validación: La validación completa en el caso de que el desarrollo y la implementación de un método se lleve a cabo por primera vez en el laboratorio, la validación parcial se realiza cuando existen modificaciones parciales a métodos ya validados y la validación cruzada en la cual se realiza una comparación de parámetros de validación de dos o más métodos donde un método se emplea como referencia. (Food and Drug Administration, 2013)

Para una validación completa se deben desafiar los siguientes parámetros de desempeño:

Selectividad: La selectividad hace referencia a la habilidad de identificar de manera inequívoca un analito de interés en presencia de otros componentes que se espera estén presentes en la muestra. (ICH, 2005)

Las interferencias hacen referencia a componentes de la matriz, otras sustancias distintas al analito de interés o impurezas que afectan la capacidad de identificar o cuantificar el analito. (SWGTOX, 2013)

El método debe discriminar los analitos de interés, de compuestos con estructuras similares que puedan estar presentes. Los interferentes incluyen componentes endógenos de la matriz, productos de descomposición, medicamentos u otros xenobioticos. (ICH, 2005)

Para su determinación se deben emplear blancos de matriz de por lo menos 6 fuentes diferentes. (Food and Drug Administration, 2013)

Linealidad: Es la capacidad de un procedimiento analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango determinado. Si existe relación lineal debe ser demostrado mediante métodos estadísticos apropiados, donde se evalúe el coeficiente de correlación, ordenada al origen, pendiente de la recta y suma de cuadrados residual. (ICH, 2005)

Para la determinación de linealidad se deben emplear al menos 5 niveles de concentración y 3 réplicas de cada nivel. (ICH, 2005)

Rango: el rango de un procedimiento analítico corresponde al intervalo de concentración del analito en que se ha demostrado que el procedimiento posee niveles adecuados de precisión, exactitud y linealidad.

Exactitud: La exactitud de una metodología analítica expresa el grado de proximidad entre los valores obtenidos y valores que se acepta como verdadero. (ICH, 2005)

La exactitud está compuesta por dos elementos: precisión en condiciones de repetibilidad y recuperación o comparación con un valor de referencia. (Eurachem, 1998)

Para la exactitud el valor medio debe estar dentro del 15% de variación, excepto para el LOQ, donde la desviación no debe superar el 20%. (Food and Drug Administration, 2013)

Recuperación: La recuperación de un analito corresponde a la respuesta instrumental obtenida del analito extraído de una matriz, en comparación con la respuesta instrumental del analito puro o sin extraer. (Food and Drug Administration, 2013)

La recuperación del analito no debe ser necesariamente del 100%, sin embargo el grado de recuperación del analito debe ser coherente, preciso y reproducible.

Para determinar la recuperación se deben emplear mínimo 3 réplicas a 3 niveles de concentración, correspondientes a un nivel bajo, medio y alto. (Food and Drug Administration, 2013)

Precisión: Expresa el grado de concordancia o dispersión entre una serie de mediciones obtenidas, considerada a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad y suele ser expresada mediante coeficientes de variación. (ICH, 2005)

Para procedimientos cuantitativos se debe determinar la precisión entre corridas y dentro de la corrida, demostrando que los coeficientes de variación son inferiores al 20%, en al menos tres niveles de concentración; para métodos cualitativos o semi cuantitativos se debe incluir el punto de decisión para la evaluación de precisión. (SWGTOX, 2013)

Repetibilidad: También conocida como precisión intra-ensayo, expresa la precisión en las mismas condiciones operacionales durante un intervalo corto de tiempo. Para su estimación se requieren mínimo 9 determinaciones que cubra el rango especificado para el procedimiento, es decir 3 réplicas a 3 niveles de concentración. (ICH, 2005)

Precisión intermedia: Expresa la precisión intra-laboratorio, a través de variaciones entre días, analistas, equipos, etc. Depende de las circunstancias en las que se pretenda emplear el procedimiento. (ICH, 2005)

Límite de detección: Por sus siglas es conocido como LOD, corresponde a la cantidad más baja de analito en una muestra que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar como un valor exacto. Para su determinación se puede emplear la evaluación visual, o empleando la relación existente entre la desviación estándar de la respuesta y la pendiente del método. (ICH, 2005)

Límite de cuantificación: Corresponde a la cantidad más baja del analito que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas. Se puede determinar comparando la respuesta del analito con la señal de ruido instrumental, donde una relación 10:1 ofrece una cuantificación fiable. (ICH, 2005)

El límite inferior de cuantificación corresponde al punto más bajo de la curva de calibración y no debe presentar una precisión superior al 20%. (Food and Drug Administration, 2013)

Robustez: Robustez es la capacidad de un método analítico para no ser afectado por pequeñas variaciones en sus condiciones, y proporciona una indicación de su fiabilidad durante el uso normal. (ICH, 2005)

Estabilidad: La estabilidad de un analíto corresponde a la capacidad para preservar su identidad en función de las condiciones de almacenamiento, propiedades químicas del analíto, la matriz y el recipiente. (Food and Drug Administration, 2013)

Idoneidad del sistema cromatográfico: Aun cuando no corresponden a un parámetro de validación, las pruebas de aptitud del sistema forman parte integral de muchos procedimientos analíticos. Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, la electrónica, las operaciones analíticas y las muestras para ser analizadas constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. Los parámetros de aptitud del sistema establecen si es adecuado para el uso previsto a través de la estimación de platos teóricos, factor de capacidad, resolución y simetría. (The United States Pharmacopeial Convention, 2006)

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente es un estudio experimental de laboratorio cuyo objeto es el desarrollar una metodología analítica, validarla e implementarla con muestras rutinarias.

No es un estudio epidemiológico y sus alcances son únicamente lo descrito en sus objetivos.

4.2 INFRAESTRUCTURA

La presente investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Toxicología Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia.

4.3 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras para el presente proyecto se obtuvieron en conjunto con la Dra. Diana Pava la tesis de la maestría en toxicología denominado: “Alteraciones neurológicas en neonatos hijos de madres consumidoras de sustancias psicoactivas atendidos en el Hospital la Victoria sedes I y II de la Ciudad de Bogotá Colombia. 2014- 2015” y con las estudiantes de enfermería Diana Barreto y Carolina Yanguma en su trabajo de grado: “Características sociodemográficas de un grupo de mujeres gestantes consumidoras de drogas de abuso, atendidas en un hospital materno infantil de Bogotá, durante cinco meses del año 2015”

Consisten en muestras de orina obtenidas de 353 mujeres quienes fueron informadas de los estudios y accedieron a participar mediante la firma del consentimiento informado. Según las condiciones de las madres, las muestras se recolectaron en el momento del parto o en el postparto en la sala de alojamiento conjunto del Instituto Materno infantil de Bogotá Colombia y el Hospital la Victoria, con el objetivo de evaluar el consumo de sustancias psicoactivas en días previos al trabajo de parto y relacionar los hallazgos con las alteraciones neurológicas de los neonatos.

Estas muestras de orina fueron recolectadas directamente en el panel multi drogas marca Xerion cuyo inserto se encuentra en el anexo 10, con el fin de realizar el screening de drogas de abuso. Las muestras de orina cuyo resultado fue positivo para metabolitos de cocaína y/o canabinoides fueron seleccionadas para la confirmación mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas.

4.4 EQUIPOS

Cromatografo de gases varian 450 GC acoplado a espectrómetro de masas de trampa de iones varian 220 MS y automuestreador varian 8400.

Columna TG-MS5, 30 m * 0,25 mm* 0,25 µm. Thermo Scientific, serial número: 1217768.

Ultrasonido Branson 1510

Centrifuga Adams de 3200 revoluciones por minuto
Evaporador de Nitrógeno Thomson
Balanza Analítica de certificada con división de escala de 0,0001g.
Varian MS Workstation, Versión 6.9.2
NIST M.S Serch Versión 2.2

4.5 REACTIVOS

Ácido acético glacial. Merck, Lote: 5276757
Diclorometano. Suprasolv, Lote: I699354-336
n-Hexano. Panreac, Lote: 0000521679
Acetato de etilo. Sigma aldrich, Lote: SZBC3170V
BSTFA+1% TMS. Cerilliant, Lote: ER08151301
Hidróxido de Sodio. 1N
Ácido Bórico. Sigma aldrich, Lote: SLBK4797V
Cloruro de Potasio. Merck, Lote: 0037089
Metanol grado HPLC. Lichosolv, Lote: I713418-341

4.6 MATERIAL DE LABORATORIO

Micropipetas graduadas de 10 a 100 μ L y de 100 a 1000 μ L
Tubos de ensayo tapa rosca.
Pipetas Pasteur de vidrio.
Pipeteador automático.
Vasos de precipitado.
Balones aforados de 10 mL, 50 mL y 100 mL
Panel multi drogas marca Xerion.
Viales 1,5 mL con inserto adaptable
Gradillas para tubos de ensayo
Cabina de extracción

4.7 MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO

Tomando en cuenta la autorización emitida por el Ministerio de Salud y Protección social de Colombia, mediante la resolución 028 de 2013 en su artículo cuarto, mediante la cual permite al Laboratorio de Toxicología de la Universidad Nacional de Colombia importar y comprar localmente estándares de referencia de sustancias estupefacientes sometidas a fiscalización, se obtuvieron a través de AS Analytica los siguientes estándares marca cerilliant:

Tabla 3 Material de referencia utilizado.

Sustancia	Presentación	Lote	Valoración
(±) 11 nor 9 carboxi delta 9 THCA	Ampolla de 100 µg/mL en metanol	FE032511-02	100 ± 0,5 µg/mL
(±) 11 nor 9 carboxi delta 9 THCA- d3	Ampolla de 100 µg/mL en metanol	FE011811-01	100 ± 0,6 µg/mL
Benzoilecgonina	Ampolla de 1000 µg/mL en metanol	FE08151108	1000 ± 5 µg/mL
Benzoilecgonina d-3	Ampolla de 100 µg/mL en metanol	FE012111-03	100 ± 0,6 µg/mL

4.8 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES Y SOLUCIÓN AMORTIGUADORA.

Las diluciones se llevan a cabo empleando la fórmula: $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$

Los estándares de referencia son llevados de manera individual a un volumen de 10 mL con metanol grado HPLC obteniendo las siguientes concentraciones:

Tabla 4 Preparación de soluciones madre.

Compuesto	Volumen inicial (mL)	Concentración inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen final (mL)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
THCA	1	100	10	10
THCA d3	1	100	10	10
BE	1	1000	10	100
BE d3	1	100	10	10

A partir de las soluciones madre, se tomaron los siguientes volúmenes de BE y THCA y completar a 10 mL con metanol grado HPLC para obtener la solución de trabajo de analitos:

Tabla 5 Preparación de las soluciones de trabajo de los analitos.

Compuesto	Volumen inicial (mL)	Concentración inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen final (mL)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
THCA	0,6	10	10	0,6
BE	0,8	100	10	8

A partir de las soluciones de $10\mu\text{g/mL}$ de THCA-d3 y BE-d3 se tomaron los siguientes volúmenes y completar a 10 mL con metanol grado HPLC para obtener la solución de trabajo de estándar interno:

Tabla 6 Preparación de las soluciones de trabajo de estándar interno.

Compuesto	Volumen inicial (mL)	Concentración inicial (µg/mL)	Volumen final (mL)	Concentración final (µg/mL)
BE d3	4	10	10	4
THCA d3	0,6	10	10	0,6

Para generar la curva de calibración se emplearon los siguientes volúmenes de la solución de trabajo de analitos:

Tabla 7 Preparación de los niveles de la curva de calibración.

	volumen Solución de trabajo de analitos (mL)				
	0,075	0,1	0,125	0,15	0,175
Concentración THCA en µg/mL para 2 mL de orina	0,0225	0,03	0,0375	0,045	0,0525
Concentración BE en µg/mL para 2 mL de orina	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70

Se emplearon en todos los casos un volumen de 100 µL de la solución de trabajo de estándar interno con el fin de obtener las siguientes concentraciones:

Tabla 8 Concentración de estándar interno en las muestras.

	volumen inicial (mL)	concentración inicial (µg/mL)	Volumen final (mL)	Concentración Final (µg/mL)
BE-d3	0,1	4	2	0,2
THCA-d3	0,1	0,6	2	0,03

Para la preparación del buffer alcalino de borato de pH 9,6 se preparó inicialmente la solución de ácido bórico y cloruro de potasio 0,2 M al disolver 0,6185 g de ácido bórico (H_3BO_3) y 0,73 g de Cloruro de potasio en agua y se completó a 50 mL; 25 mL de esta solución fueron llevados a un balón de 100 mL, se adicionaron 18,45 mL de NaOH 0,2 N y se completó a volumen con agua destilada. (The United States Pharmacopeial Convention, 2006)

4.9 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Para la validación de la metodología analítica se enriqueció la orina de un voluntario no consumidor de cocaína ni cannabis, mediante la adición de THCA y BE en las cantidades reportadas en la tabla y, con el fin de alcanzar 5 concentraciones para cada analíto, partiendo desde el límite de cuantificación.

Para la evaluación de los parámetros de desempeño se emplean pruebas de hipótesis; los criterios de aceptación se observan en la tabla 11

Idoneidad: Se determinó empleando las 5 repeticiones del sistema, correspondiente al nivel 2 de la curva de calibración, con una concentración de 0,03 ug/mL de THCA y 0,4 ug/mL de BE.

Selectividad: Se evaluó la orina de 6 voluntarios no consumidores de cocaína y cannabis; adicionalmente se enriquecieron orinas con posibles interferentes relacionados con el consumo simultaneo de drogas de abuso y se empleó la metodología analítica para el desarrollo de ejercicios interlaboratoriales.

Linealidad y rango: El rango lineal fue establecido mediante una curva de calibración de 5 puntos y 5 réplicas para cada punto, donde las concentraciones de THCA empleadas fueron 0,0225, 0,03, 0,0375, 0,045 y 0,0525 ug/mL y para BE unas concentraciones de 0,30, 0,40, 0,50, 0,60 y 0,70 ug/mL, tanto para el sistema como para el método.

La preparación de estos puntos y los volúmenes de estándar con los cuales se enriquece la orina se encuentran en la tabla 7.

Límite de detección: Se evaluó de forma experimental mediante inspección visual, realizando diluciones sucesivas hasta la concentración en la cual se encontró una señal integrable y los iones característicos para cada analito.

Límite de cuantificación: El LOQ que se estableció para la metodología analítica corresponde al límite inferior de las curvas de calibración, siendo 0,0225 ug/mL para THCA y 0,30 ug/mL para BE.

Exactitud: Se evaluó mediante el porcentaje de recuperación, evaluando la respuesta instrumental de la curva de calibración del sistema, en relación a las orinas enriquecidas a iguales concentraciones, dentro del rango dinámico evaluado por 5 niveles y 5 réplicas para cada nivel.

Precisión: La precisión en condiciones de repetibilidad se evaluó mediante los coeficientes de variación determinados para las 5 réplicas de cada uno de los niveles de la curva de calibración, tanto en sistema como en método.

Precisión intermedia: Se evaluó mediante 5 réplicas a un nivel intermedio dentro del rango lineal de cada analito, realizadas por dos analistas diferentes y en dos días por el mismo analista. El procesamiento de las muestras se realizó desde el enriquecimiento de las orinas con THCA y BE.

Robustez: Al igual que en el trabajo desarrollado por Sabogal, para evaluar la robustez se empleó un modelo "Plackett Burman" con el fin de evaluar 7 factores mediante 8 unidades experimentales. Los factores evaluados se observan en la tabla 23. (Sabogal, 2010)

Estabilidad: Con el fin de evaluar la estabilidad de los analitos en condiciones reales de almacenamiento, las muestras que generaron un resultado positivo

en la prueba confirmatoria, fueron evaluadas en sus condiciones de almacenamiento 3 meses después en la misma condición de ausencia de luz, en frascos plásticos y a una temperatura de aproximadamente -20°C.

4.10 CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo con la resolución N° 008430 DE 1993 emitida por el ministerio de salud, el presente trabajo corresponde a una investigación con riesgo mínimo pues emplea recolección de muestras no invasivas. (Ministerio de salud, 1993)

Para la toma de las muestras se contó con el consentimiento informado y por escrito de los sujetos de estudio, obtenidos en conjunto con el proyecto “Alteraciones neurológicas en neonatos hijos de madres consumidoras de sustancias psicoactivas atendidos en el Hospital la Victoria sedes I y II de la Ciudad de Bogotá Colombia. 2014-.2015”, mediante el cual autorizan su participación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos, beneficios y riesgos, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna. La carta de consentimiento informado fue presentada según la información solicitada en el artículo 15 de dicha resolución

Los documentos anteriormente mencionados fueron sometidos al comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y el hospital de la victoria como se muestra en los anexos 8 y 9.

Los participantes en el proyecto de investigación declaramos que no existen conflictos de intereses.

4.11 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

En un tubo de ensayo se tomaron 2 mL de agua destilada, con el fin de obtener el blanco de reactivos. Para el blanco de orina se usaron 2 mL de orina de un voluntario que advierta no haber consumido cannabis ni cocaína; para el control positivo se tomaron 2 mL de orina de un voluntario no consumidor y fueron enriquecidos con 100µL de la solución B que contiene los analitos de interés en una concentración de 0,6 µg/mL de THCA y 8 µg/mL de BE, para

cada una de las muestras de interés se tomaron 2 mL de orina en un tubo de ensayo.

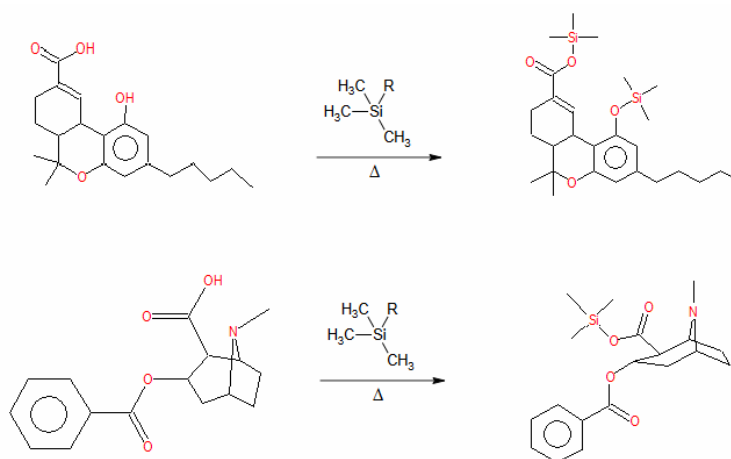
Tabla 9 Tratamiento de las muestras.

Adicionar 100 µL de la solución de trabajo de estándar interno a las muestras, con excepción del blanco de reactivos y blanco de orina	
EXTRACCIÓN BÁSICA	
Ajuste a pH alcalino	Adición de 3 mL de la solución amortiguadora de borato pH 9,6. Agitar y verificar pH.
Adición de solvente de extracción	Adicionar aproximadamente 5 mL de Diclorometano, tapar y poner en ultrasonido por 15 minutos, posteriormente centrifugar por 15 minutos.
Separación de fases	Retirar la fase acuosa de la parte superior, empleando una pipeta Pasteur de vidrio, recuperar la fase orgánica en un tubo de ensayo limpio.
HIDRÓLISIS ALCALINA	
Ajuste pH	A cada una de las muestras adicionar 500µL de NaOH 1N agitar y tapar.
Hidrólisis	Calentar a aproximadamente 50°C durante 15 minutos. Dejar enfriar.
EXTRACCIÓN ÁCIDA	
Ajuste de pH	Adicionar 1 mL de ácido acético glacial, agitar y verificar pH de aproximadamente 4
Adición de solvente de extracción	Adicionar 5 mL de la mezcla de Hexano y acetato de etilo a una proporción 9:1, tapar y poner en ultrasonido por 15 minutos, posteriormente centrifugar por 15

	minutos.
Separación de fases	Retirar la fase orgánica de la parte superior a un nuevo tubo de ensayo con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio, desechar la fase acuosa de la parte inferior del tubo.
EVAPORACIÓN SOLVENTE ORGÁNICO	
Evaporación solvente orgánico	Calentar hasta sequedad la fase orgánica obtenida, empleando una temperatura de aproximadamente 40°C y corriente de Nitrógeno
DERIVATIZACIÓN Y ANÁLISIS	
Reconstitución con agente derivatizante	Adicional 50µL de BSTFA+1% de TMS, agitar y tapar.
Derivatización	Llevar a 80°C por 20 minutos. Dejar enfriar. Empleando una pipeta Pasteur de vidrio, llevar a inserto para viales de 2 mL para su análisis por GC/MS

Cuando se pretende realizar el análisis de BE se emplea la extracción básica y para el análisis de THCA la hidrólisis alcalina y extracción ácida, las fases orgánicas resultantes son sometidas a evaporación y derivatización para análisis por GC/MS; la reacción de derivatización se observa en la figura 4. En caso de realizar el análisis de manera simultánea, la fase acuosa resultante de la extracción básica se emplea para el análisis de THCA y las fases orgánicas obtenidas de ambas extracciones son recuperadas en el mismo tubo de ensayo.

Figura 4 Reacciones de derivatización para THCA y BE



Adaptado por los autores de NIST MS search 2.2

Para preparar los sistemas se adicionó a tubos de ensayo secos la cantidad del estándar preparado en metanol mencionado en la tabla 8, con el fin de obtener el equivalente a cada concentración deseada, posteriormente se secó el metanol a 40 °C en presencia de una corriente de nitrógeno. Una vez secos, se procedió a realizar la reconstitución con el agente derivatizante y derivatización, de la misma manera que con las muestras de orina.

4.12 PARÁMETROS INSTRUMENTALES

Para la optimización del sistema cromatográfico se desarrollaron una serie de ensayos, inyectando sistemas con el fin de obtener la respuesta cromatográfica idónea para los analitos y sus respectivos estándares internos, evaluada posteriormente a través de la idoneidad del sistema cromatográfico.

La columna empleada fue una TG-5MS compuesta por un 5% difenil 95% dimetil polisiloxano; las condiciones cromatográficas empleadas se encuentran en la figura 5.

Figura 5 Condiciones cromatográficas.

COMPONENTE	ITEM	CONDICION
Inyector tipo 1177	Oven Power	"On"
	Temperatura	310 °C
	Split	Modo splitless (Split ratio 1:1)
Columna	Columna	TG-MS5, 30 m * 0,25 mm* 0,25 µm. Thermo Scientific, serial número: 1217768.

Horno	Tiempo de estabilización	0.1 minutos
	Temperatura inicial	150 °C
	Rata de temperatura	20 °C/min
	Temperatura final	290 °C sostener por 3 minutos
	Tiempo de la corrida	10 minutos
Automuestreador 8400	Capacidad de la jeringa	10 uL
	Volumen de inyección	3 uL
	Profundidad en la muestra	90%
	Profundidad en el solvente	90%
	Lavados en el solvente	3
	Lavados en la muestra	3
	Velocidad de inyección	5 uL/seg

Las condiciones del espectrómetro 220 MS se referencian en la figura 6, donde el segmento 2 corresponde al intervalo de tiempo donde se encuentra la BE y BE-d3, y el segmento 3 donde eluyen el THCA y THCA-d3, empleando diferentes rangos en las masas detectadas y diferentes formas de almacenamiento de iones en la trampa de iones, con el fin de favorecer tanto la respuesta instrumental como la sensibilidad.

Figura 6 Condiciones del espectrómetro de masas Varian 220 MS.

ITEM	CONDICION
Corriente	10 uA
Modo de ionización	EI
Count threshold	1 count
Scan time	0.5 segundos
Tiempo de inicio segmento 1	5 minutos
Tiempo final segmento 1	8 minutos
Rango de masas fragmento 1	70 m/z- 400 m/z

Modo de ionización del fragmento 1	<pre> Mass Range Ion. Storage Level Ion. Time Factor ----- 10 to 99 35.0 m/z 100% 100 to 249 35.0 m/z 100% 250 to 384 35.0 m/z 100% 385 to 410 5.0 m/z 10% 411 to 650 30.0 m/z 90% </pre>
Tiempo de inicio segmento 2	8 minutos
Tiempo final segmento 2	10 minutos
Rango de masas fragmento 2	250 m/z – 510 m/z
Modo de ionización del fragmento 2	<pre> Mass Range Ion. Storage Level Ion. Time Factor ----- 10 to 99 35.0 m/z 100% 100 to 249 35.0 m/z 100% 250 to 384 40.0 m/z 100% 385 to 415 5.0 m/z 10% 416 to 650 30.0 m/z 90% </pre>
RF	650 m/z

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA

La elección adecuada de la metodología empleada para la extracción se ve reflejada en la sensibilidad y especificidad de una metodología analítica y depende tanto de las características propias del analito como de las condiciones e infra estructura del laboratorio en que se planea desarrollar, en el caso de sistemas de extracción para drogas de abuso en matrices biológicas se suele emplear la extracción líquido- líquido o en fase sólida. (UNODC, 2013)

La extracción líquido- líquido de matrices biológicas requiere del empleo de un pH adecuado, acorde con el pKa del analito de interés, en caso de ser diferentes sustancias y para realizar un análisis selectivo, puede darse el caso de requerir diferentes valores de pH y diferentes solventes de extracción. (UNODC, 2013)

Cuando un analito de interés se encuentra en medio acuoso a bajas concentraciones, la extracción mediante un solvente orgánico se basa en la distribución de la forma no ionizada entre la fase acuosa y el solvente tras

alcanzar el equilibrio. En la extracción líquido- líquido de muestras libres o con bajo contenido de proteínas, el rendimiento está determinado por el equilibrio de la distribución del analito entre las fases o coeficiente de reparto, el equilibrio de disociación electrolítica para extracciones pH dependientes y la relación de volúmenes entre fases. (Negrusz & Cooper, 2015)

Con el fin de coextraer la menor cantidad de impurezas, la bibliografía recomienda una relación 2:1 entre la fase orgánica y la acuosa. Un criterio importante para la selección del solvente de extracción corresponde a la polaridad, la cual depende de la electronegatividad de la molécula y su simetría, bajo el principio de “lo similar disuelve lo similar”. (Negrusz & Cooper, 2015)

Otro aspecto importante en la selección del solvente de extracción es la potencial toxicidad para el analista, inflamabilidad y potencial explosivo.

De acuerdo con la ecuación de Henderson- Hasselbach, un compuesto ácido o básico se encuentra ionizado en un 50% a un pH igual al pKa de la sustancia. Se ha demostrado que para sustancias ácidas la mejor extracción se logra a dos unidades por debajo del pKa y para sustancias básicas a dos unidades de pH sobre el pKa, debido a que en estas condiciones cerca del 99% de la sustancia se encuentra en su forma no ionizada. (Negrusz & Cooper, 2015)

Con el fin de supervisar el procedimiento de extracción, el estándar interno debe adicionarse en la etapa más temprana posible y debe poseer propiedades fisicoquímicas similares a las del analito, con el fin de compensar la pérdida del analito de interés. (Negrusz & Cooper, 2015)

La detección del estándar interno tras realizar un análisis asegura que en la etapa de extracción se recuperó con éxito el analito en caso de estar presente, de tal manera que algunas de las pérdidas en el proceso pueden no ser críticas, debido a que se compensa con pérdidas en una misma relación del estándar interno. (Bertholf & Winecker, 2007)

El empleo de isótopos estables como estándar interno puede reducir el efecto matriz, y compensar las pérdidas de los analitos durante el proceso, por ejemplo, a diferencia del THCA glucurónido, el THCA libre no es hidrosoluble y

el rendimiento de la extracción puede disminuir debido a su adsorción por tubos de ensayo de polipropileno, sin embargo ésta se presenta en la misma proporción para el estándar interno deuterado. (Yuan, Chen, & Wang, 2015)

Se han desarrollado una amplia variedad de métodos de extracción para el análisis de THCA y BE, particularmente de la orina.

Debido a que algunos metabolitos excretados por orina contienen un conjugado glucurónico, como es el caso del THCA, se requiere la escisión hidrolítica de estos conjugados antes de la extracción con el fin de favorecer la recuperación. (Negrusz & Cooper, 2015)

Dentro de los métodos de hidrólisis se encuentra el uso de una enzima específica, sin embargo suele aumentar los costos del análisis y el tiempo requerido para la preparación de las muestras, sin embargo se logran obtener extractos más limpios. Existe una serie de preparaciones comerciales de glucuronidasas y sulfatasas, cuyo desempeño depende de un pH óptimo y una temperatura controlada. (Negrusz & Cooper, 2015)

Por otra parte se encuentra la hidrólisis química, la cual ofrece un enfoque más económico y rápido y los extractos son apropiados para el análisis cromatográfico. Se emplean, dependiendo del enlace que se desee romper, condiciones ácidas o alcalinas y altas temperaturas. La desventaja de este tipo de hidrólisis es la estabilidad del analito, por tanto previo a su uso se requiere una revisión de las condiciones a emplear con el fin de no degradar el analito ni obtener subproductos indeseados. (Negrusz & Cooper, 2015)

En casos particulares, como las benzodiazepinas se recomienda el uso de la hidrólisis enzimática, debido a que la hidrólisis ácida lleva compuestos como el diazepam, temazepam y ketazolam a 2-metil amino 5 clorobenzofenona, lo cual genera confusión en el análisis de resultados. Sin embargo para la hidrólisis del conjugado glucurónico del THCA se encuentran reportados ambos métodos de hidrólisis sin presentar productos indeseados y un alto rendimiento. (Negrusz & Cooper, 2015)

La policía del estado de Idaho emplea la hidrólisis básica, con el fin de romper el conjugado glucurónico del THCA, mediante la adición de KOH 1 M a 40 °C

por 15 minutos, seguido por una extracción en medio ácido empleando una mezcla de hexano: acetato de etilo en una relación 87:13. (Idaho State Police, n.d.)

Fu y Lewis realizan la hidrólisis de 1 mL de muestra a temperatura ambiente mediante la adición de 100 μ L de hidróxido de sodio 6 N, para posterior acidificación del medio mediante la adición de 300 μ L de ácido clorhídrico 6 normal para la extracción de THCA. (Fu & Lewis, 2008)

Needleman desarrolló una extracción líquido-líquido para THCA empleando una mezcla 9:1 de hexano: isobutanol, con posterior derivatización con hidróxido de tetrametil amonio y dimetil sulfóxido, adicionando iodo metano para posterior análisis por cromatografía de gases con espectrometría de masas; Clouette y colaboradores emplearon una mezcla de hexano: acetato de etilo 7:1,5 para la extracción en medio ácido y derivatizando con MTB-STFA a 110°C por 15 minutos, adicionalmente demostraron que el derivado con trimetil silil es más estable que otros derivados empleados para el análisis de THCA. Para la extracción líquido-líquido en un paso, se ha demostrado que el solvente orgánico con mayor eficiencia para el aislamiento del THCA corresponde a una mezcla 9:1 de hexano: acetato de etilo. (Bogusz, 2000)

Bouchene y Belhadj igualmente emplean como solvente de extracción una mezcla de hexano y acetato de etilo en proporción 9:1. (Bouchene, Sadeg, & Belhadj-tahar, 2013)

La naturaleza hidrofílica de la Benzoilecgonina dificulta la selección del solvente orgánico a emplear durante la extracción, además del control que se debe tener sobre el pH, pues a un pH demasiado alcalino la Benzoilecgonina puede pasar de su forma no ionizada a una catiónica. (Billings, 2003)

Debido a que la extracción líquido-líquido es pH dependiente según las propiedades del analíto de interés, en el caso de sustancias levemente básicas se recomiendan el empleo de soluciones tampón, por ejemplo el buffer de borato de sodio para pH 9. (Negrusz & Cooper, 2015)

Needleman y Goodin emplean 3 mL de la muestra y extraen la Benzoilecgonina tras alcalinizar el medio con hidróxido de amonio, empleando una mezcla de

diclorometano y etanol 1:1. Este tipo de extracción conlleva poco tiempo y disminuye el uso de solventes debido a que se desarrolla mediante un solo paso; sin embargo los solventes orgánicos, particularmente los clorados, poseen un alto grado de toxicidad, por lo cual es indispensable su manipulación bajo cabina de extracción y con los elementos de protección personal necesarios para proteger la salud del analista. (Needleman, Goodin, & Severino, 1991)

En diferentes extracciones se observa el uso del diclorometano debido a su elevada polaridad y menor toxicidad que la del cloroformo, sin embargo se reporta la formación de emulsiones en la interfaz con la fase acuosa, particularmente debido a la presencia de adulterantes o sangre. (Needleman et al., 1991)

El procedimiento empleado por el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses emplea el diclorometano a pH básico para la extracción de Benzoilecgonina y la hidrólisis alcalina a 56° mediante la adición de hidróxido de potasio 10 normal, acidificación del medio con ácido acético glacial y extracción de cannabinoides empleando una mezcla de hexano y acetato de etilo 9:1. (Benavides & Jaramillo, 2011). Este tipo de extracción favorece el análisis simultáneo tanto de sustancias ácidas como de sustancias básicas, lo cual reduce los costos, tiempos requeridos y la cantidad de muestra requerida. (Benavides & Jaramillo, 2011)

La corriente de nitrógeno reduce la presión parcial directamente sobre el líquido para acelerar la evaporación. Este paso se realizaría con el fin de eliminar el oxígeno. (Vallejo, 2012)

Tras ensayar las diferentes metodologías analíticas reportadas en la literatura para la extracción de THCA y BE, se encontró que la metodología que proporciona resultados más limpios, un LOD más bajo y un mayor porcentaje de recuperación se mostró en la tabla 9.

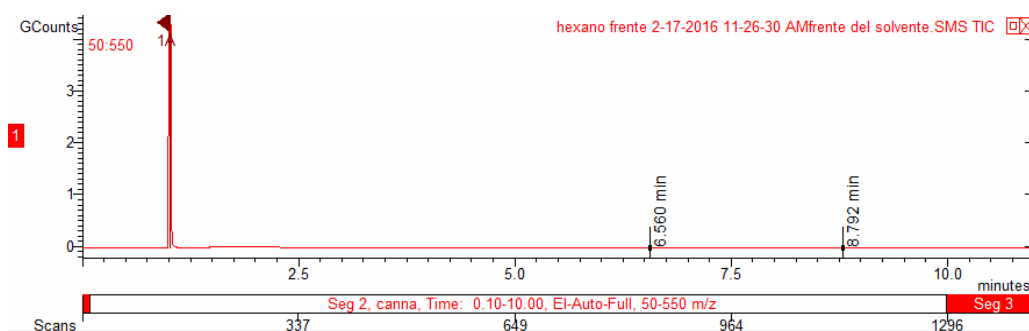
5.2 IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Se determinó empleando las 5 repeticiones del sistema, correspondiente al nivel 2 de la curva de calibración, con una concentración de 0,03 µg/mL de THCA y 0,4 µg/mL de BE.

Tabla 10 Idoneidad del sistema cromatográfico.

Nombre	tr prom (min)	Desviación estándar	cv	W prom (min)	K	R	N
BE	6,578	0,00192	0,0292	0,0176	5,455		768787,773
THCA	8,826	0,00339	0,0384	0,0273	7,661	58,942	578154,888

Figura 7. Frente del solvente.



El número de platos teóricos (N) hace referencia al número teórico de equilibrios que suceden entre el analito de interés y la fase estacionaria en una corrida cromatográfica, su valor está relacionado con el ancho del pico y el tiempo de retención para cada analito y depende entre otros factores de las características de la columna, su estado y longitud. Es un indicador de la eficiencia y vida útil de la columna a través de su poder separativo, en función de las características de la columna; se recomienda cambiar la columna una vez el número de platos teóricos se encuentre por debajo del 70% del valor inicial.

El factor de capacidad (k) corresponde a la retención de un analito por parte de la columna, independientemente del flujo de la fase móvil.

Por su parte la resolución (R), correspondiente a la capacidad de la columna, bajo ciertas condiciones cromatográficas, para separar dos compuestos componentes de una mezcla, de tal manera que las bases de los picos se

encuentren separadas una de otra, debe poseer un valor numérico superior a 0,9 para garantizar una adecuada separación. (The United States Pharmacopeial Convention, 2006). Es un factor fundamental en cromatografía pues permite determinar que no existe superposición de picos, sin embargo cuando dos analitos presentan el mismo tiempo de retención pueden diferenciarse si cuentan con iones característicos diferentes.

Tras la optimización del sistema instrumental se obtienen los siguientes espectros para cada uno de los analitos:

Figura 8 Cromatograma y espectro de masas de BE.

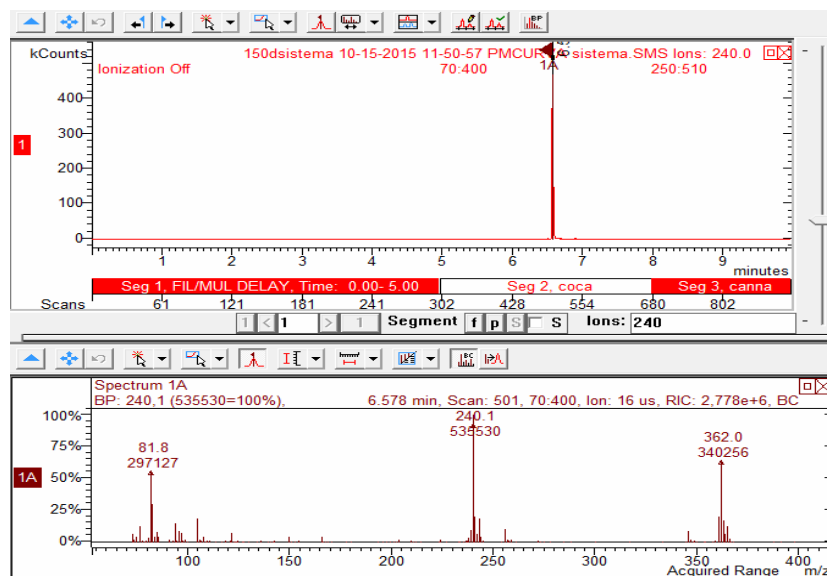


Figura 9 Cromatograma y espectro de masas BE-d3.

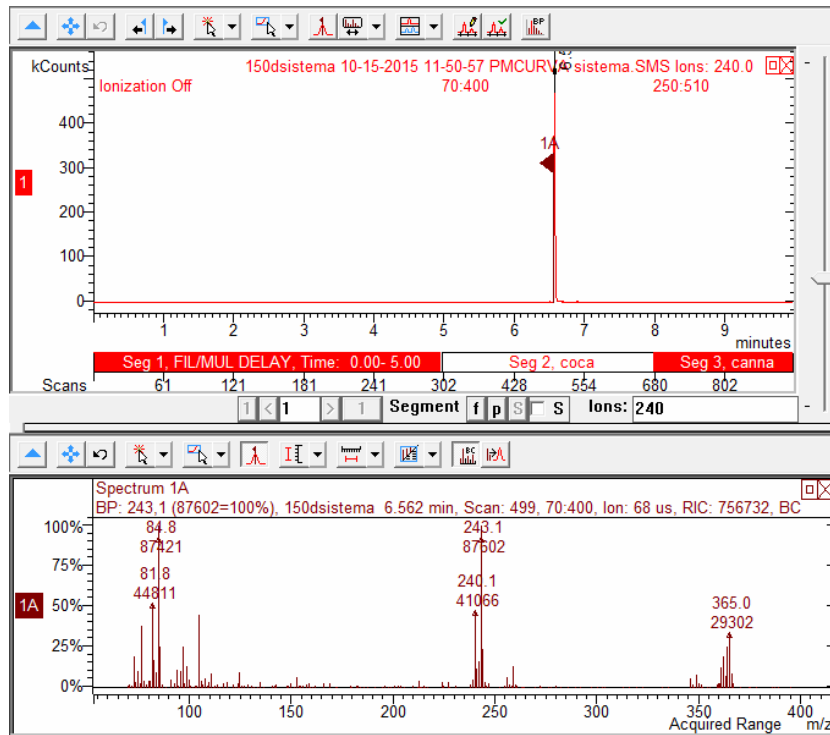


Figura 10 Cromatograma y espectro de masas de THCA.

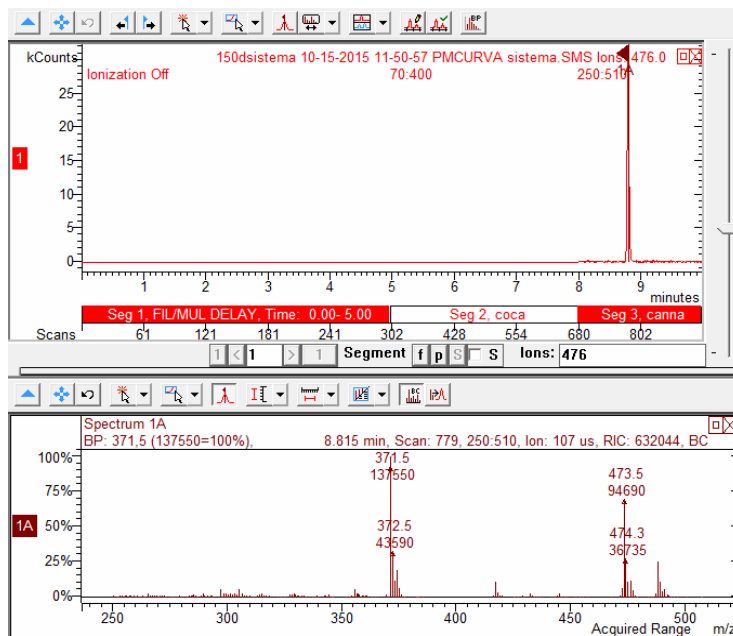
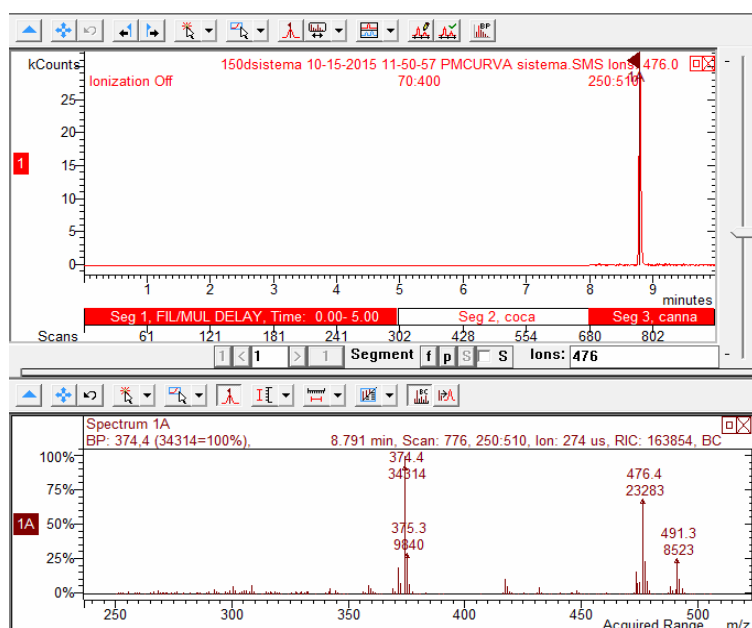


Figura 11 Cromatograma y espectro de masas de THCA-d3.

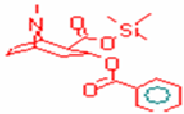


Dado que los estándares internos corresponde a formas deuteradas de los analitos de interés, la BE y BE-d3 coeluyen, al igual que el THCA y THCA-3. Sin embargo, la espectrometría de masas permite la diferenciación mediante la identificación de los espectros y la relación carga/masa de las moléculas.

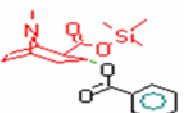
Los iones observados en cada uno de los espectros corresponden a fragmentos específicos para cada molécula obtenidos tras el proceso de ionización, para BE y THCA se observan en rojo en las figuras 12 y 13 respectivamente.

Figura 12 Fragmentación de BE.

m/z	mass	formula	loss	type	rate	abund
361	361.170935	C ₁₉ H ₂₇ NO ₄ Si	-	parent		100



m/z	mass	formula	loss	type	rate	abund
240 (1/3)	240.14198	C ₁₂ H ₂₂ NO ₂ Si	C ₇ H ₅ O ₂	dissociation	-65	303



m/z	mass	formula	loss	type	H	rate	abund
82 (1/2)	82.0656743	C ₅ H ₈ N	C ₁₄ H ₁₉ O ₄ Si	H-transfer in ring	-1	0	999

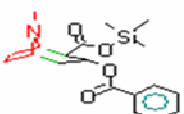
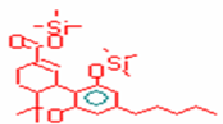
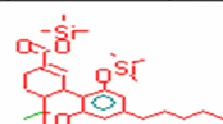


Figura 13 Fragmentación de THCA.

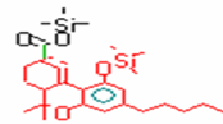
m/z	mass	formula	loss	type	rate	abund
488	488.277813	C ₂₇ H ₄₄ O ₄ Si ₂	-	parent		260



m/z	mass	formula	loss	type	rate	abund
473 (2/9)	473.254337	C ₂₆ H ₄₁ O ₄ Si ₂	CH ₃	dissociation	-38	409



m/z	mass	formula	loss	type	db shift	rate	abund
371	371.240631	C ₂₃ H ₃₅ O ₂ Si	C ₄ H ₉ O ₂ Si	dissociation	Yes	-48	999



5.3 VALIDACION DE LA METODOLOGÍA ANALITICA

Tabla 11 Resumen de la validación de la metodología analítica.

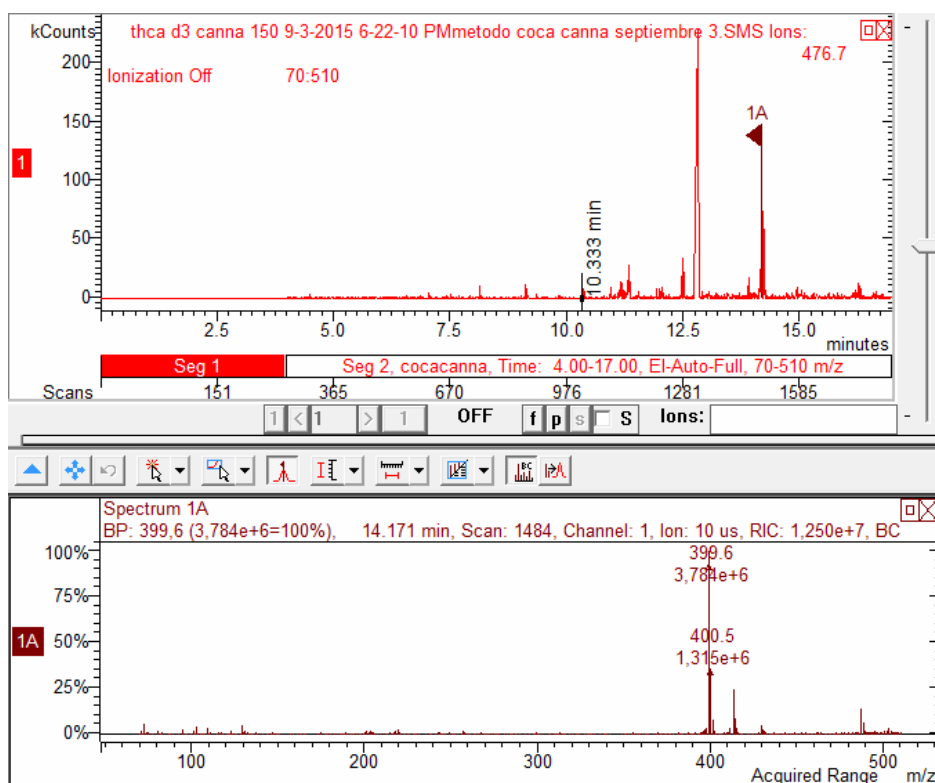
PARAMETRO	ESPECIFICACION	BE		THCA			
		RESULTADO	CONCLUSION	RESULTADO	CONCLUSION		
Resolucion	Resolucion mayor a 2	58,9400		Cumple			
Selectividad	No existen interferencias provenientes de componentes de la matriz, otras sustancias distintas al analito de interés o impurezas que afectan la capacidad de identificar y cuantificar los analitos.	No se observan interferencias que afecten la capacidad de identificar o cuantificar los analitos de interes.		Cumple			
Linealidad Metodo	Coeficiente de correlacion	t tabla	2,0687	Cumple	t tabla	2,0739	
		t calculado	22,9704		t calculado	20,7388	
	pendiente	t tabla	2,0687	Cumple	t tabla	2,0739	
		t calculado	22,9704		t calculado	20,7388	
convergencia al origen	t tabla	2,0739	Cumple	t tabla	2,0739		
	t calculado	2,8723		t calculado	1,7319		
ANOVA	ANOVA	F tabla	7,2395E-17	Cumple	F tabla	5,4328E-16	
		F calculado	527,6394		F calculado	435,7783	
Linealidad Sistema	Coeficiente de correlacion	t tabla	2,0739	Cumple	t tabla	2,0739	
		t calculado	28,0617		t calculado	20,7388	
	pendiente	t tabla	2,0739	Cumple	t tabla	2,0739	
		t calculado	28,0617		t calculado	20,7388	
	convergencia al origen	t tabla	2,0739	Cumple	t tabla	2,0739	
		t calculado	7,5330		t calculado	1,7319	
	ANOVA	ANOVA	t tabla	1,0181E-18	Cumple	t tabla	4,3284E-17
			F calculado	787,4586		F calculado	553,9044
Exactitud	Recuperacion	100,0686		Cumple			
Precision	Horwitz	< Que el maximo permitido para cada nivel		Cumple			
	CV	<15% en cada nivel		Cumple			
	ANOVA dias	F tabla	4,6672	Cumple	F tabla	4,5431	
		F calculado	0,0155		F calculado	0,0050	
ANOVA analista	F tabla	4,6672	Cumple	F tabla	4,5431		
	F calculado	0,0002		F calculado	0,0001		
LOQ	Señal integrable, iones caracteristicos	0,1 ug/mL		Cumple			
LOD	CV<20%	0,15ug/mL	CV=2,9%	Cumple	0,0225 ug/mL	CV=7,5%	
Robustez	Modelo de Placket Burman	El metodo es robusto en los aspectos evaluados.		Cumple			
Estabilidad				Cumple			

Se demuestra así que la metodología analítica cumple los parámetros de desempeño requeridos para la determinación de THCA y BE en orina como biomarcadores de exposición a cocaína y cannabis.

5.3.1 SELECTIVIDAD

La selectividad fue evaluada inicialmente empleando orinas de 6 voluntarios no consumidores, sin embargo al trabajar el sistema en modo full scan se observaba un interferente desconocido, propio de la matriz que coelúa con el THCA, aun al variar las condiciones cromatográficas. El interferente poseía un ion característico de relación masa/carga de 399, que debido a su abundancia impedía la detección de THCA y THCA-d3 como se observa en la figura 14.

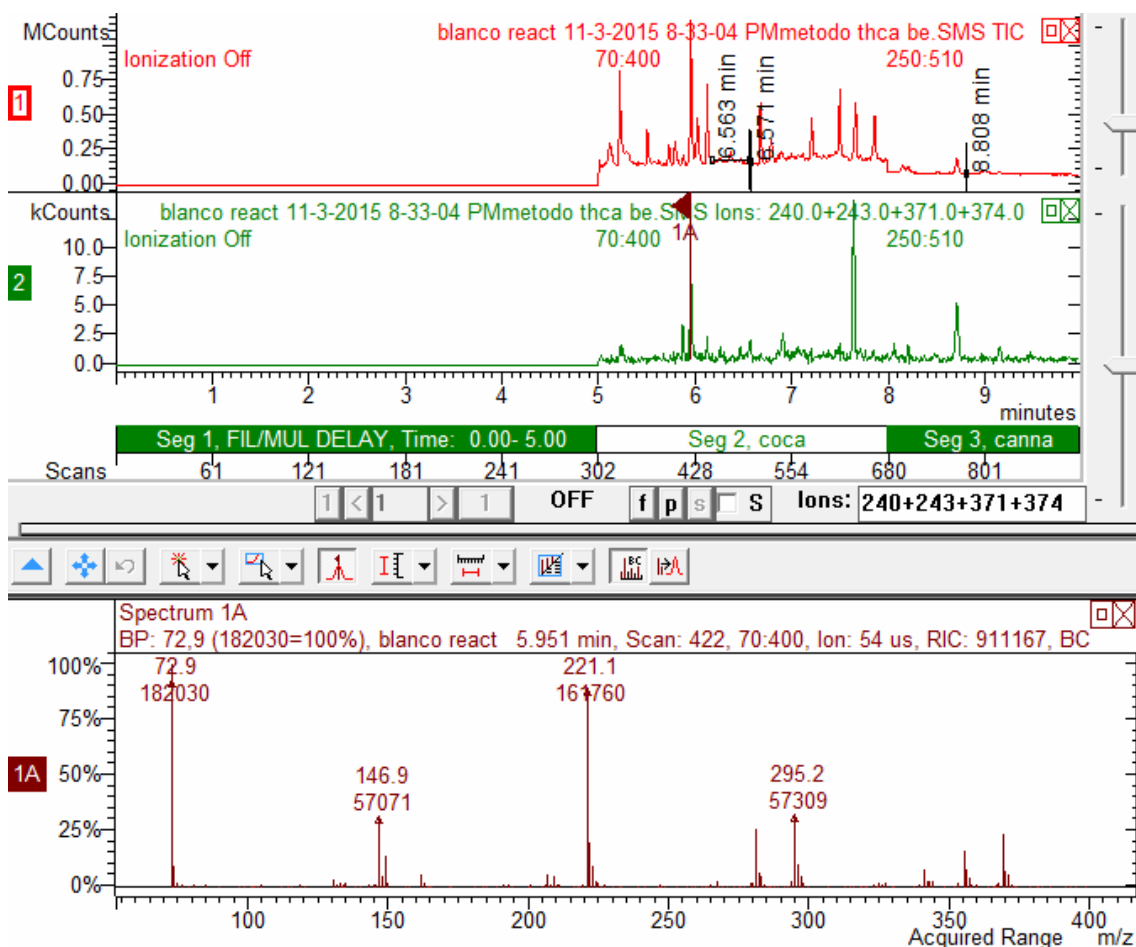
Figura 14 Cromatograma y espectro de masas de interferente de la matriz.



Sin embargo, el empleo de una trampa de iones permite realizar una selección de los tiempos y niveles de almacenamiento de los iones, de tal manera que se inhibió la presencia del ion 399 a través del ajuste en el segmento 3, como se observa en la figura 6, donde se disminuye el factor de tiempo y nivel de los iones con una relación carga masa entre 385 y 415.

De esta manera se encuentra que el método es selectivo en cuanto a elementos propios de la matriz.

Figura 15 Cromatograma y espectro de masas del blanco de reactivos.



Para evaluar la selectividad respecto a productos de biotransformación y potenciales interferentes se analizaron las sustancias mostradas en la tabla 12, donde la cafeína y levamisol corresponden a dos de los adulterantes más comunes de la cocaína; se observa que tanto la cocaína como el cocaetileno, a pesar de compartir su núcleo estructural con la Benzoilecgonina logran distinguirse por tiempo de retención y espectro de masas. (Sabogal, 2010)

Se evaluó la selectividad con respecto a otras sustancias de potencial abuso que pueden estar presentes en la orina, debido al fenómeno de poli consumo de los usuarios de sustancias psicoactivas, dentro de ellos se encuentran la 6 monoacetil morfina, la cual corresponde al biomarcador de exposición a heroína; algunas anfetaminas, benzodiazepinas, sustancias estimulantes y depresoras.

Se observa entonces que la metodología analítica es selectiva para el análisis de THCA y BE, puesto que cada uno de los compuestos evaluados posee iones característicos diferentes a los de los analitos de interés, lo cual permite su identificación de manera inequívoca incluso en caso de presentar tiempos de retención similares.

Tabla 12 Resultados de selectividad.

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN	IONES CARACTERÍSTICOS
Midazolam	8,264	310+ 443
MMDA	5,626	73+ 299
Tramadol	5,130	58+ 263
6 Acetil morfina	8,037	399+340+287
Cafeina	9,514	194+209
Anfetamina	6,972	116+73
Levamisol	6,108	204+148
Clorpromazina	7,687	318+272+86
Cocaetileno	6,540	196+318+82
Cocaína	6,327	303+182+82
Codeina	7,417	371+178
Diclofenaco	6,613	367+214
Escopolamina	6,924	138+94
Imipramina	6,383	234+194
Ketamina	5,423	180+209
Lorazepam	8,923	429+355
metotrimeprazina	7,815	328+282

5.3.2 LINEALIDAD Y RANGO

El modelo de calibración hace referencia al modelo matemático que demuestra la relación entre los cambios de concentración del analito y la variación de la respuesta instrumental dentro de un rango de trabajo. (SWGTOX, 2013)

El rango lineal fue establecido desde el LOQ de cada analito, de tal manera que para THCA las concentraciones empleadas fueron 0,0225, 0,03, 0,0375, 0,045 y 0,0525 µg/mL y para BE unas concentraciones de 0,30, 0,40, 0,50, 0,60 y 0,70 µg/mL.

El método de inspección consiste en observar el coeficiente de correlación r , donde algunos autores mencionan que cuando tiende a la unidad se considera como evidencia suficiente de que la respuesta instrumental responde a una función lineal, sin embargo; esta evaluación no corresponde a una evaluación estadística. Es así que las diferentes guías para la validación de métodos bioanalíticos, no solo no expresan un valor mínimo de r o su interpretación en cuanto a grado de linealidad, sino que además indican la necesidad de evaluar mediante un modelo estadístico apropiado. (Araujo, 2009)

En este caso se aplica el modelo $y=mx+b$ donde “y” corresponde a la relación de áreas entre el analito y el estándar interno, “m” a la pendiente, “b” al intercepto con el eje x y la variable “x” a la concentración del analito. Esta escala lineal se emplea en casos de varianza homogénea para la respuesta instrumental dentro de un rango de concentración. (Rozet et al., 2007)

Figura 16 Gráfico de linealidad para método de BE

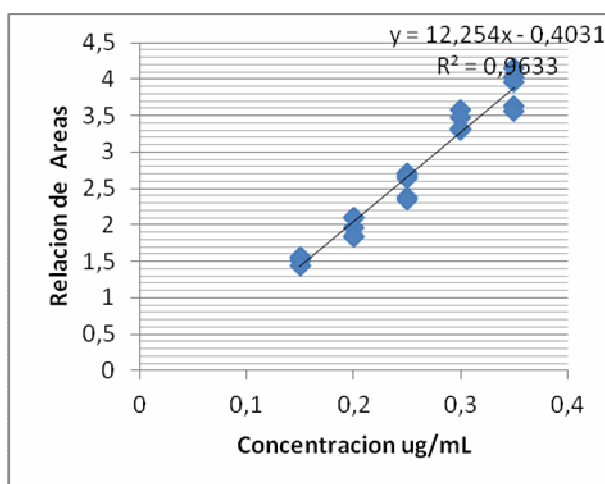


Figura 17 Gráfico de linealidad para sistema de BE.

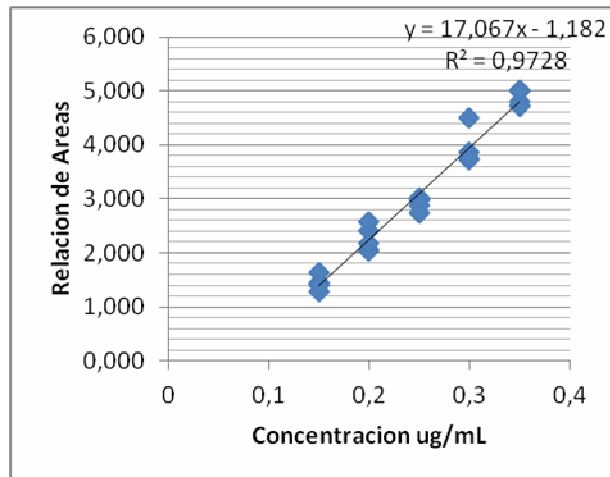


Figura 18 Gráfico de linealidad para método de THCA.

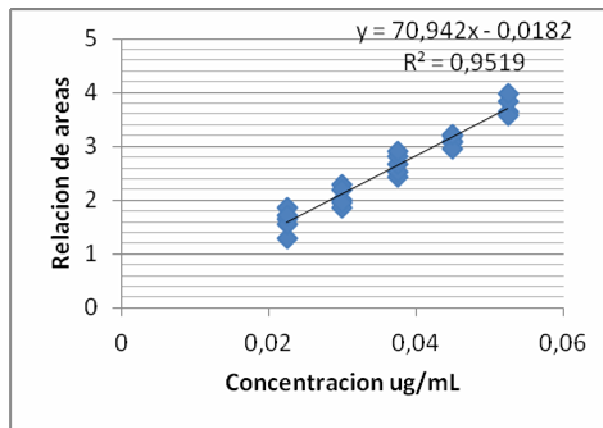


Figura 19 Gráfico de linealidad para sistema de THCA.

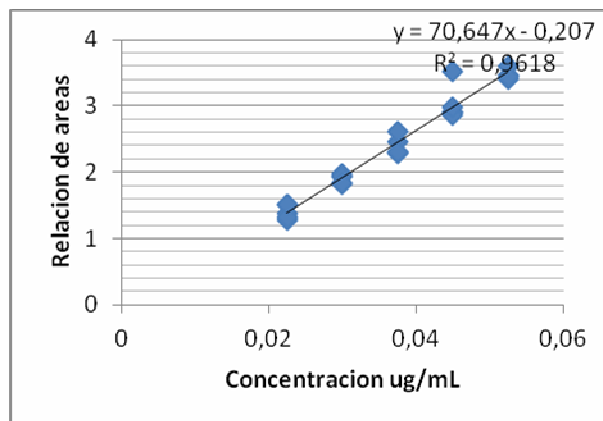


Tabla 13 Resumen de linealidad de la metodología analítica.

	Coeficiente de correlacion		Pendiente		convergencia al origen		
	n		sb		sa		
sistema BE	t exp.	28,0616935	t exp	28,0616935	t exp	7,53300619	
	t (a, n-2)	2,07387307	t (a, n-2)	2,07387307	t (a, n-2)	2,07387307	
	CONCLUSION	Se rechaza	CONCLUSION	Se rechaza	CONCLUSION	Se rechaza	
	n	24	sb	0,60818137	sa	0,15690903	
metodo BE	t exp.	22,9704036	t exp	22,9704036	t exp	2,8723456	
	t (a, n-2)	2,06865761	t (a, n-2)	2,06865761	t (a, n-2)	2,06865761	
	CONCLUSION	Se rechaza	CONCLUSION	Se rechaza	CONCLUSION	Se rechaza	
	n	25	sb	0,53040375	sa	0,13544349	
Sistema THCA	t exp.	22,7694245	t exp	22,7694245	t exp	3,35392552	
	t (a, n-2)	2,07387307	t (a, n-2)	2,07387307	t (a, n-2)	2,07387307	
	CONCLUSION	Se rechaza	CONCLUSION	Se rechaza	CONCLUSION	Se rechaza	
	n	24	sb	3,32174124	sa	0,12830382	
Metodo THCA	t exp.	20,7388383	t exp	20,7388383	t exp	1,73189742	
	t (a, n-2)	2,07387307	t (a, n-2)	2,07387307	t (a, n-2)	2,07387307	
	CONCLUSION	Se rechaza	CONCLUSION	Se rechaza	CONCLUSION	No Se rechaza	
	n	24	sb	3,66581733	sa	0,14159392	
ANALISIS DE VARIANZA PARA BE							
Fv	GL	SC	CM	Fcal	F tab	CONCLUSION	
Regresion	1	18,769	18,76	602,96	4,279	CUMPLE	Diferencia
Falta de Ajuste	3	0,2	0,068	2,66	3,098	CUMPLE	No diferencia
error residual	23	0,72	0,031				
error puro	20	0,51126	0,0254				
total	24	19,5					
ANALISIS DE VARIANZA PARA THCA							
Fv	GL	SC	CM	Fcal	F tab	CONCLUSION	
Regresion	1	14,323	14,323	498,738	4,279	CUMPLE	Diferencia
Falta de Ajuste	3	0,06	0,0189	0,628	3,098	CUMPLE	No diferencia
error residual	23	0,66	0,0287				
error puro	20	0,603	0,0301				
total	24	15					

Tanto para los sistemas como para los métodos de THCA y BE, se rechaza que el coeficiente de correlación sea igual a 0, de la misma manera que se rechaza que la pendiente sea igual a 0.

Para el caso del intercepto con el eje X, se encuentra que para BE no se rechaza la convergencia al origen, sin embargo para THCA, tanto en el sistema como en el método se rechaza esta hipótesis. Se ha demostrado por diferentes autores que forzar una función lineal a cero no es necesario, debido a que puede dar lugar a un incremento en el error de los resultados. (Rozet et al., 2007)

5.3.3 LIMITE DE DETECCIÓN

Se evaluó en la matriz debido al aumento en la línea base que se presenta tras la extracción de los analitos en orina. Se determinó que el límite de detección para el método corresponde al cut off recomendado por SAMHSA siendo 0,1 $\mu\text{g/mL}$ para BE y 0,015 $\mu\text{g/mL}$ para THCA; tras realizar diluciones por debajo de estas concentraciones no se obtuvo una señal integrable ni se observaban los iones característicos para los analitos. En las figuras 20 y 21 muestran los cromatogramas referentes al LOD para THCA y BE.

Es indispensable que la metodología analítica posea un LOD inferior o igual al punto de corte establecido para cada sustancia, pues contar con un LOD superior al punto de corte propicia la aparición de falsos negativos en ese rango de concentraciones.

De esta manera, las orinas con concentraciones iguales o superiores al punto de corte para THCA y BE se consideran como positivas para la exposición activa a cannabis y cocaína.

Las guías de validación aportadas por la ICH sugieren que el LOQ debe estar encima de 10 veces la relación de señal y ruido; y para el LOD por encima de 3. Adicionalmente existen modelos que emplean la estimación basados en la curva de calibración, sin embargo este responde a un modelo teórico, de esta

manera en metodologías bioanalíticas la aproximación más adecuada corresponde a la inspección visual, es decir, donde se observe un pico cromatográfico bien definido, que genere una señal integrable y estén presentes los iones característicos para cada analito. (Rozet et al., 2007).

Figura 20 Cromatograma y espectro de masas del LOD de THCA.

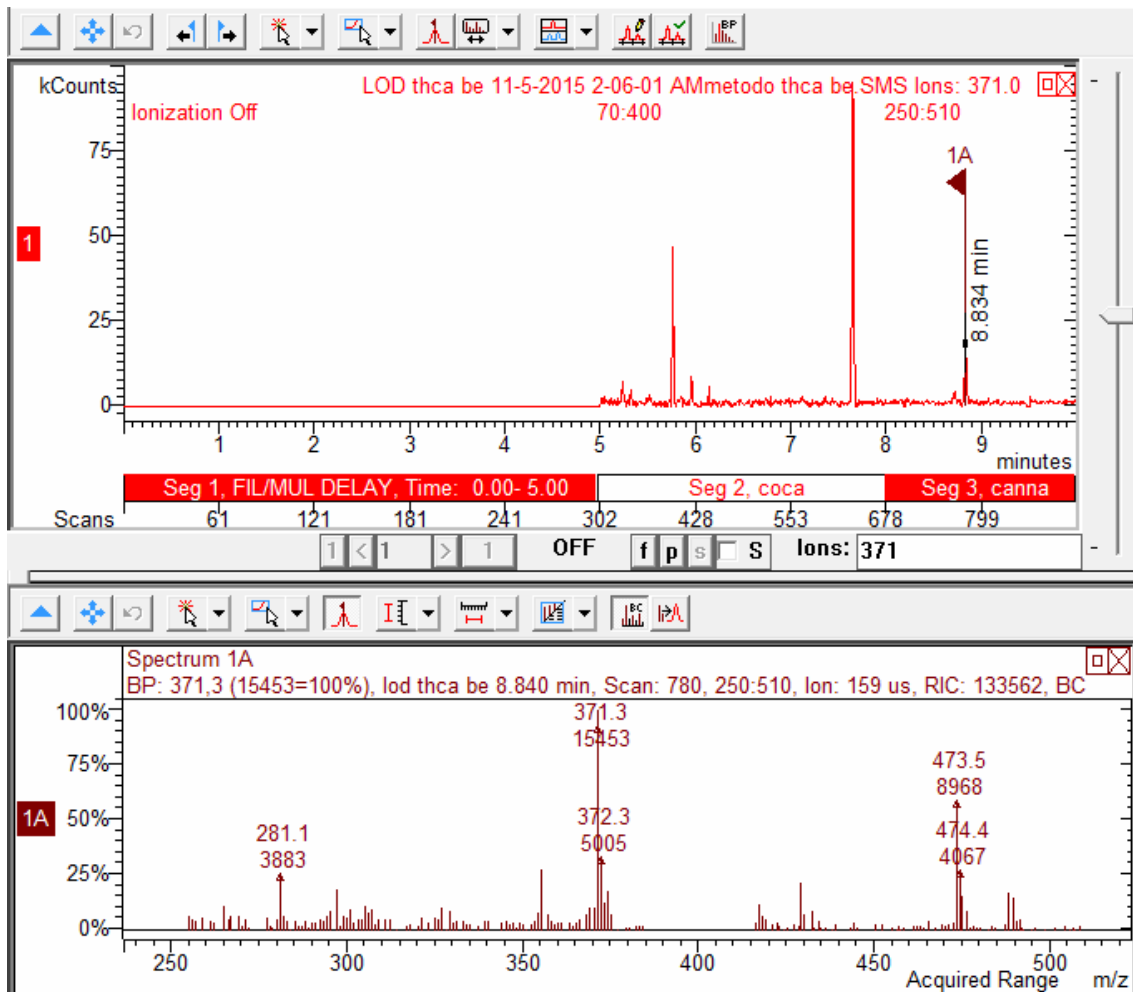
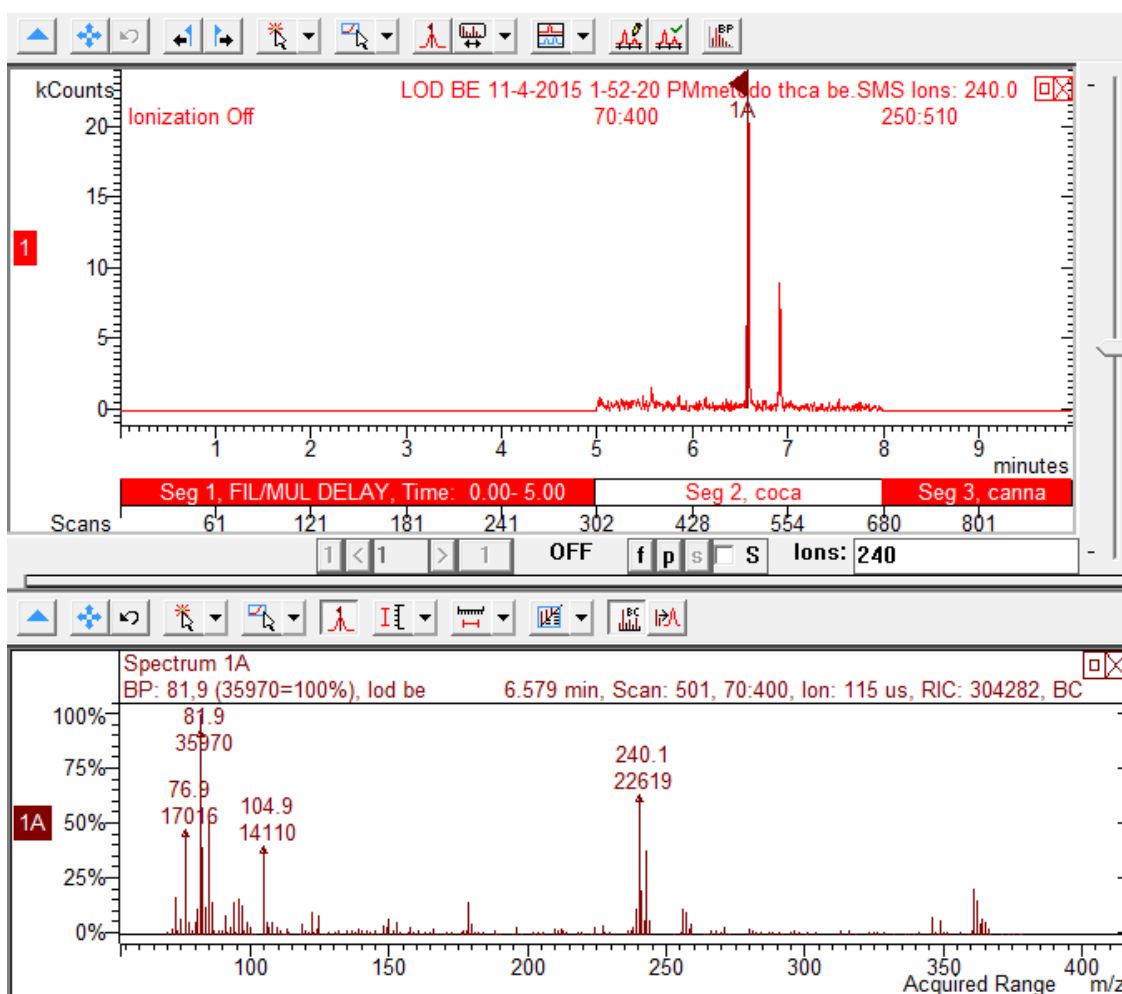


Figura 21 Cromatograma y espectro de masas del LOD de BE



5.3.4 LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación corresponde al punto más bajo de la curva de calibración, siendo 0,0225 $\mu\text{g/mL}$ para THCA y 0,3 $\mu\text{g/mL}$ para BE. En ambos casos se obtiene una precisión con un coeficiente de variación menor al 20% como se muestra en las tablas 16 a la 19. Los resultados obtenidos entre el LOD y el LOQ se reportan como positivos o de manera semicuantitativa como superior al LOD; los resultados por encima del LOQ se pueden reportar de manera cuantitativa, sin embargo, debido a la naturaleza de la matriz orina y la interpretación de los resultados, se recomienda en todo caso reportar de manera semicuantitativa.

5.3.5 RECUPERACION

Tabla 14 Resultados de recuperación para THCA.

concentración teórica (µg/mL)	promedio relación de áreas sistema (n=5)	promedio relación de áreas método (n=5)	concentración según ecuación para sistema	concentración según ecuación para método	porcentaje de recuperación
0,0225	1,4018	1,652	0,0227	0,0235	103,406
0,03	1,9026	2,195	0,0298	0,0312	104,483
0,0375	2,3858	2,868	0,0367	0,0406	110,871
0,045	3,0370	3,246	0,0459	0,0460	100,222
0,0525	3,4793	3,779	0,0521	0,0535	102,593
Promedio					104,315

Tabla 15 Resultados de recuperación para BE.

concentración teórica (µg/mL)	promedio relación de áreas sistema (n=5)	promedio relación de áreas método (n=5)	concentración según ecuación para sistema	concentración según ecuación para método	porcentaje de recuperación
0,150	1,436	1,518	0,153	0,156	102,019
0,200	2,254	1,968	0,201	0,193	96,121
0,250	2,922	2,550	0,240	0,241	100,31
0,300	3,964	3,396	0,301	0,310	103,048
0,350	4,850	3,867	0,353	0,349	98,835
promedio					100,0685

Exactitud está relacionada con el error sistemático y refleja la calidad de un método analítico, no solo el resultado obtenido. En este caso se toma como valor verdadero al sistema, el cual no ha sufrido pérdidas por el proceso de extracción y se expresa además como porcentaje de recuperación. (Rozet et al., 2007)

La recuperación se refiere también a la eficacia del proceso de extracción del analito. (Food and Drug Administration, 2013). Para esta metodología analítica se obtuvo una recuperación de aproximadamente 100% para BE y 104% para THCA, lo cual se atribuye tanto a la eficiencia de la extracción como a la adición de estándares internos deuterados, de tal manera que las pérdidas del analito son compensadas con pérdidas del estándar interno en la misma proporción debido a su similitud estructural y por tanto en sus propiedades físico químicas y adicionalmente permite minimizar las variaciones en los procesos de inyección.

Para metodologías bioanalíticas se aceptan porcentajes de recuperación superiores al 50%, siempre y cuando sean reproducibles, de ahí la importancia de evaluar la precisión.

5.3.6 PRECISIÓN

En este caso se expresa a través del coeficiente de variación, el cual expresa el error aleatorio asociado a una metodología analítica y es considerada dentro de las corridas y entre las corridas, se establece en las diferentes guías que el CV no debe superar el 15%, con excepción del LOQ donde no debe superar el 20%.

Adicionalmente se comparó con el CV máximo permitido, calculado mediante la ecuación de Horwitz, el cual no fue superado por ningún analito en los niveles de concentración evaluados.

Al obtener coeficientes de variación menores a los límites establecidos a través de las guías de validación para metodologías bioanalíticas se determinó que el

error aleatorio debido al grado de dispersión no afecta de manera significativa el resultado obtenido.

Tabla 16 Resultados de precisión para sistema de BE.

sistema BE				
concentración	promedio relación de áreas (n=5)	cv calculado	cv según Horwitz	Conclusión
0,15	1,437	8,815	21,3	Cumple
0,2	2,254	10,518	20,4	Cumple
0,25	2,922	3,993	19,7	Cumple
0,3	3,965	9,115	19,2	Cumple
0,35	4,851	3,060	18,7	Cumple

Tabla 17 Resultados para precisión del método de BE.

Método BE				
concentración	promedio relación de áreas (n=5)	cv calculado	cv según Horwitz	Conclusión
0,15	1,518	2,903	21,3	Cumple
0,2	1,968	6,637	20,4	Cumple
0,25	2,550	6,679	19,7	Cumple
0,3	3,396	3,643	19,2	Cumple
0,35	3,867	6,564	18,7	Cumple

Tabla 18 Resultados de precisión para el sistema de THCA

Sistema THCA				
concentración	promedio relación de áreas (n=5)	cv calculado	cv según Horwitz	Conclusión

0,0225	1,401	7,524	27,9	Cumple
0,03	1,902	3,557	27,1	Cumple
0,0375	2,385	6,017	26,2	Cumple
0,045	3,037	9,059	25,5	Cumple
0,0525	3,479	2,439	24,9	Cumple

Tabla 19 Resultados de precisión para el método de THCA

Método THCA				
concentración	promedio relación de áreas (n=5)	cv calculado	cv según Horwitz	Conclusión
0,0225	1,610	13,023	27,9	Cumple
0,03	2,064	8,691	27,1	Cumple
0,0375	2,675	7,227	26,2	Cumple
0,045	3,111	3,563	25,5	Cumple
0,0525	3,758	4,845	24,9	Cumple

Tabla 20 Anova de precisión intermedia para BE.

Fuente	GL	SC	CM	Fcal	Ftab	Conclusión
Analista	1	0,00396	0,00396	0,00022315	4,667	CUMPLE
Día	1	0,27501	0,27501	0,01546096	4,667	CUMPLE
Error	13	231,242	17,78790			
Total	15	231,5217				

Tabla 21 Anova de precisión intermedia para THCA

Fuente	GL	SC	CM	Fcal	Ftab	Conclusión
Analista	1	0,0009169	0,0009169	5,2156E-05	4,543	CUMPLE
Día	1	0,08704018	0,0870402	0,00495085	4,543	CUMPLE
Error	15	263,712	17,580			
Total	17	263,802				

Tras realizar un análisis de varianza con el fin de evaluar la precisión intermedia, se encuentra que tanto para el análisis de BE como de THCA la precisión no cambia entre días así como tampoco cambia entre analistas. (Fcalculado < Ftabulado)

Se concluye entonces que la metodología es precisa tanto en condiciones de repetibilidad como de reproducibilidad.

5.4 ROBUSTEZ

Al igual que en el trabajo desarrollado por Sabogal, para evaluar la robustez se empleó un modelo "Placket Burman" con el fin de evaluar 7 factores mediante 8 unidades experimentales. (Sabogal, 2010) Se evalúan por separado los factores de la A a la E, debido a que en el proceso inicial de la extracción para BE y THCA se emplean condiciones diferentes; tras recuperar en el mismo tubo de ensayo las fases orgánicas se evalúa la misma variación para los factores F y G.

Tabla 22 Diseño Placket Burman

Corrida	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	B	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	D	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	F	F	F	f	f	F
G/g	G	g	G	G	g	G	G	g

Tabla 23 Factores evaluados en robustez

Factores Robustez BE				Factores Robustez THCA			
	Factor	Valor Nominal	Valor Alternativo		Factor	Valor Nominal	Valor Alternativo
A	Volumen de Solución amortiguadora	3 mL	5 mL	A	Volumen de Ácido Acético glacial	1 mL	0,5 mL
B	Volumen de Diclorometano	5 mL	6 mL	B	Relación Hexano: Acetato de etilo	9.1	8.2
C	Agitación tras adición de solvente orgánico	Centrifuga	Ultrasonido	C	Agitación tras adición de solvente orgánico	Centrifuga	Ultrasonido
D	Tiempo de centrifuga	15 minutos	10 minutos	D	Tiempo de centrifuga	15 minutos	10 minutos
E	Tiempo de Ultrasonido	15 minutos	10 minutos	E	Tiempo de Ultrasonido	15 minutos	10 minutos
F	Temperatura de Evaporación	50°C	40°C	F	Temperatura de Evaporación	50°C	40°C
G	Temperatura de Derivatización	80°C	70°C	G	Temperatura de Derivatización	80°C	70°C

Tabla 24 Resultados de robustez

Robustez BE				Robustez THCA			
Corrida	Relación de Áreas	Concentración BE	Promedio	Corrida	Relación de Áreas	Concentración	Promedio
1	2,5687	0,2428	0,2349	1	2,8054	0,0398	0,0408
1	2,388	0,2279		1	2,7952	0,0397	
1	2,463	0,2341		1	3,023	0,0429	
2	2,3313	0,2233	0,2277	2	2,984	0,0423	0,044
2	2,4091	0,2297		2	3,2509	0,0461	
2	2,4165	0,2303		2	3,0691	0,0435	
3	2,6086	0,246	0,2452	3	2,851	0,0404	0,0418

3	2,5544	0,2416		3	2,9138	0,0413	
3	2,6306	0,2478		3	3,0749	0,0436	
4	2,7713	0,2594	0,2473	4	3,2173	0,0456	0,0436
4	2,4448	0,2326		4	2,8962	0,0411	
4	2,657	0,25		4	3,1065	0,044	
5	2,2718	0,2184	0,237	5	2,7568	0,0391	0,0401
5	2,6322	0,248		5	2,8322	0,0402	
5	2,5899	0,2445		5	2,8919	0,041	
6	2,4324	0,2316	0,243	6	3,4248	0,0485	0,0471
6	2,7743	0,2596		6	3,0691	0,0435	
6	2,5071	0,2377		6	3,4775	0,0493	
7	2,4044	0,2293	0,2474	7	3,2531	0,0461	0,0432
7	2,6086	0,246		7	3,1072	0,0441	
7	2,864	0,267		7	2,7688	0,0393	
8	2,5616	0,2422	0,2443	8	3,2307	0,0458	0,0448
8	2,6825	0,2521		8	3,1671	0,0449	
8	2,5166	0,2385		8	3,0841	0,0437	

Tabla 25 Análisis de resultados de robustez

Robustez BE			Robustez THCA		
	Calculo de la diferencia	Diferencia Significativa		Calculo de la diferencia	Diferencia Significativa
A-a	-0,00411892	NO	A-a	-0,00126373	NO
B-b	-0,01039661	NO	B-b	-0,00034181	NO
C-c	0,00054457	NO	C-c	-0,00341126	NO
D-d	-0,00451357	NO	D-d	3,12E-05	NO
E-e	0,00196183	NO	E-e	0,00091936	NO
F-f	4,04E-05	NO	F-f	-0,00168911	NO
G-g	0,00463958	NO	G-g	0,00098394	NO
Desv Est Repetibilidad Método	0,2447162		Desv Est Repetibilidad Método	0,27521741	

Como evidencian los resultados, variaciones en los parámetros evaluados no afectan la reproducibilidad de los resultados, debido a que las diferencias calculadas para los parámetros evaluados mediante el diseño Placket Burman no superan en ninguno de los casos la desviación estándar de la repetibilidad del método; de tal manera que la metodología analítica se considera robusta respecto a estos parámetros; lo cual es un indicador de confianza en cuando a su aplicación en análisis rutinario.

5.5 ESTABILIDAD:

La estabilidad hace referencia a la conservación de las propiedades iniciales de los analitos de interés en una muestra biológica en función de las condiciones de transporte y almacenamiento; con el fin de evaluarla se realizó el análisis de las muestras obtenidas con un resultado positivo tras un periodo de tres meses tras el análisis inicial, obteniendo que para todos los casos se reitera un resultado positivo para BE y THCA.

El almacenamiento se realizó a aproximadamente -20°C , en los cup test de polipropileno en que se realizó el screening y en ausencia de luz.

Tabla 26 Estabilidad de los analitos en las muestras.

	muestra numero	día 0	mes 3
THCA	154	positivo	positivo
	171	positivo	positivo
	176	positivo	positivo
	269	positivo	positivo
BE	36	positivo	positivo
	43	positivo	positivo
	54	positivo	positivo
	152	positivo	positivo
	204	positivo	positivo
	272	positivo	positivo
THCA y BE	81	positivo	positivo
	146	positivo	positivo

5.6 APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA

El montaje de las muestras de interés para la confirmación de la presencia de THCA y BE mediante la metodología validada se realizó siguiendo la secuencia reportada en el anexo 7.

En el montaje de la secuencia para el análisis de las muestras se ponen inicialmente un blanco de reactivos y uno de orina. Al verificar la ausencia de picos cromatográficos y de los iones de interés en el tiempo de retención de los analitos que se desean evaluar, se constata en el blanco de reactivos que ninguno de ellos se encuentre contaminado; de igual manera que en el blanco

de orina permite evidenciar interferencias propias de la matriz con los analitos de interés.

De igual manera se coloca el extracto de una muestra de orina la cual fue enriquecida con los analitos de interés en una concentración igual límite de detección. La confirmación de la presencia de los analitos de interés en el LOD y el estándar interno al inicio de la secuencia evidencia los criterios para validar los posteriores análisis; por una parte evidencia la sensibilidad del instrumento, de tal manera se garantiza que se detecten los resultados positivos obtenidos en una concentración superior al punto de corte; indica que el proceso de extracción es eficiente en las posteriores muestras a analizar y finalmente permite verificar los espectros y tiempos de retención para la secuencia.

Al finalizar la secuencia, se coloca una segunda muestra la cual fue enriquecida a una concentración igual al límite de detección para BE y THCA, donde la verificación de la presencia de los analitos nos demuestra que a lo largo de la secuencia no se ve afectada la capacidad de respuesta del instrumento.

Para que un resultado se considere positivo, los principales iones del analito de interés presentes en la muestra de referencia, deben estar presentes en la muestra desconocida; puede darse el caso de tener perdida de algunos iones en la muestra desconocida debido a la baja abundancia en el espectro de masas, de ahí la importancia de la selección adecuada de los iones a monitorear.

Tras verificar los criterios anteriormente mencionados se procede con el análisis de resultados de las muestras de orina, montadas por duplicado. Entre muestra y muestra se coloca un solvente, en este caso hexano, con el fin de validar los resultados positivos. Se analiza cada uno de los solventes para evaluar la presencia de los analitos de interés y estándares internos, en caso de encontrar uno de los analitos en un hexano previo a una muestra positiva, no es posible validar el resultado, debido a que existe el riesgo de que el analito provenga de una contaminación en el sistema cromatográfica por una muestra previa. Para el caso particular de estos resultados se observa que en

ninguno de los hexanos se encuentran los analitos de interés, validando así todos los resultados.

El carry over o efecto memoria hace referencia a la aparición de señal no deseada del analito en muestras posteriores a una muestra positiva.

Estos controles de calidad permiten aceptar o rechazar los resultados de una forma objetiva, pues debido a que la revisión clínica, el auto reporte o el direccionamiento de la solicitud de análisis puede presentar prejuicio, se requiere de la imparcialidad y fiabilidad de las conclusiones analíticas, así como la correcta interpretación toxicológica. (UNODC, 2013)

Los resultados se presentan como “no detectado” en lugar de “negativo”, debido a que la ausencia de los analitos en la orina al momento del análisis puede no solo deberse a la ausencia de consumo, pues también puede encontrarse en una concentración inferior al límite de detección o que los biomarcadores de exposición han sido eliminados. De ahí la importancia de adaptar los puntos de corte y conocer las ventanas de detección de las sustancias en la matriz de interés.

En los casos que se encuentran los analitos de interés, el resultado se reporta como “positivo” o superior al límite de detección, pues un resultado cuantitativo puede llevarse a malas interpretaciones. Como ya ha sido mencionado, la concentración de los analitos en la orina no se puede relacionar con el tiempo desde el consumo, la cantidad administrada o los patrones de consumo del individuo; la correcta interpretación de un resultado positivo corresponde a la exposición activa a la droga de abuso dentro de un rango de tiempo.

5.7 ANALISIS DE MUESTRAS PRELIMINARES POSITIVAS.

Las muestras se recolectaron en cup test desde Diciembre de 2014 hasta Junio de 2015 y fueron almacenados en ausencia de luz y a aproximadamente -20°C; transcurrieron 3 meses desde la finalización de la toma de muestras hasta el análisis confirmatorio. Al tomar la información referida en la literatura en cuanto a estabilidad, y las pruebas realizadas en el proceso de validación se encuentra

que este tiempo transcurrido no influye de manera significativa en la degradación de los analitos de interés.

Tabla 27 Resultados de las pruebas preliminares

Resultado obtenido en la prueba preliminar	Numero de resultados
No Detectado	191
OPI	8
BAR	25
MTD	6
AMP	0
THC	18
COC	23
BZO	36
TCA	15
MET	4
PCP	27
Total de positivas	162

En la tabla 27 se observa la cantidad de muestras de orina que arrojaron resultados positivos en la prueba preliminar para alguna de las sustancias analizadas en el inmunoensayo, mediante los cuales se evidencia el posible uso o abuso de las sustancias en días previos al parto; sin embargo se requiere de confirmación analítica, relación con el reporte de los medicamentos consumidos por las pacientes y los resultados de la evaluación clínica, con el fin de descartar los falsos positivos.

De las muestras de orina tomadas a 353 madres, 18 muestras generaron resultados positivos en el screening para cannabinoides y 23 para cocaína, de los cuales se confirmó la presencia de BE en 10 muestras y de THCA en 8 muestras, resultados que se evidencian en la tabla 28.

Es de especial importancia identificar a las mujeres que durante la gestación consumieron cocaína, ya que como lo evidencian Damin y Grau al igual que otros investigadores, el consumo de cocaína durante el embarazo puede generar hipercontractilidad uterina, además de disminuir el flujo sanguíneo en el útero y de esta manera vasoconstricción placentaria. También se asocia el consumo de cocaína durante el embarazo con abortos espontáneos y partos

prematuros. En cuando al neonato aumenta el riesgo de presentar malformaciones , particularmente en el tracto urinario, a nivel cardio vascular, neurológico y en el sistema digestivo; incluso una dosis única consumida durante el embarazo puede generar isquemia, sangrado cerebral, convulsiones e hipertensión en el recién nacido, sufrimiento fetal así como bajo peso al nacer o muerte súbita. (Damin & Grau, 2015)

Se ha descrito que un consumo de cocaína previa al momento del parto puede conducir a graves complicaciones como hipotensión, trombocitopenia, alteración en la percepción del dolor y un comportamiento combativo, adicionalmente las complicaciones cardiovasculares relacionadas con el uso de cocaína aumentan significativamente durante el embarazo debido al aumento en la demanda de oxígeno. (Kuczkowski, 2002)

En cuanto al cannabis existe preocupación debido a su naturaleza lipofílica y facilidad para atravesar membranas, como en el caso de la placenta. Estudios en animales sugieren afecciones en el cerebro de hijos de madres consumidoras, lo cual se ve reflejado en daños a largo plazo a nivel emocional, cognitivo y comportamental. Se ha demostrado que la exposición a cannabis durante el desarrollo fetal genera problemas de atención, memoria y afectación en la resolución de problemas. (Metz & Stickrath, 2015)

Un riesgo conocido corresponde al síndrome de hiperémesis cannabinoide, que puede aparecer en el neonato tras consumo crónico de cannabis por parte de la gestante. Los resultados cardiovasculares del cannabis pueden potenciar la acción anestésica de los fármacos en el momento del parto, dando como resultado una depresión miocárdica. (Metz & Stickrath, 2015)

En aplicaciones similares de pruebas rápidas en mujeres gestantes como las realizadas por Wong y colaboradores, se evidenció que la implementación de estas pruebas incrementa la detección de consumo de sustancias durante el embarazo, lo cual facilita la intervención, incluyendo tratamiento para la madre y el neonato, además de un seguimiento y acompañamiento abordado por grupos multidisciplinarios. (Wong et al., 2011) Como resultado de su estudio, Chang resalta que un resultado positivo no es un diagnostico sino una

orientación, la cual debe ser relacionada con los efectos clínicos observados. (Chang, 2014)

Eichel y Johannemann, quienes implementan la aplicación de pruebas rápidas con el fin de identificar candidatos de presentar síndrome de abstinencia neonatal resaltan que la aplicación de esta metodología no ha sido plenamente estandarizada y resaltan que la prueba ideal para la determinación de exposición a drogas de abuso por parte de las madres durante la gestación corresponde al meconio del neonato, el cual se forma durante un tiempo mayor al último trimestre de la gestación; permitiendo así una mayor ventana de detección. Sin embargo no se han desarrollado pruebas rápidas para el análisis preliminar de drogas de abuso en meconio, lo cual genera un reto para la investigación. (Eichel & Johannemann, 2014)

En la guía establecida por el ministerio de salud de Nueva Gales del Sur, se menciona que no es recomendado el uso de análisis de drogas de abuso para todas las maternas de manera rutinaria, sino que deben ser llevadas a cabo cuando se consideren un aporte para el diagnóstico o se presuma un consumo de drogas de abuso por parte de la madre. (NSW Department of Health, 2006)

Azadi y Dildy llevaron a cabo un estudio similar, con el objetivo de establecer la prevalencia del consumo de drogas en mujeres atendidas en el servicio de obstetricia del Hospital Universitario de New Orleans, haciendo énfasis en que la historia ofrecida por las maternas corresponde a una herramienta muy pobre en la determinación del consumo de sustancias psicoactivas, sin embargo en este estudio al igual que otros reportados, no se aplican metodologías analíticas confirmatorias. (Azadi & Dildy, 2008) Por tanto la aplicación de cromatografía de gases con espectrometría de masas como metodología confirmatoria permite avanzar en este ámbito particular de la investigación, en lo concerniente al consumo de sustancias psicoactivas; además de brindar una herramienta a la población general y futuros estudios realizados con el apoyo del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

La identificación del consumo de drogas de abuso durante el embarazo no solamente tiene impacto en ámbitos clínicos, pues adicionalmente se ha

resaltado en la literatura el alto riesgo de presentar diferentes tipos de abusos o negligencia en el cuidado de hijos de madres farmacodependientes. (Cressman, Natekar, Kim, Koren, & Bozzo, 2014)

En el caso de los resultados positivos en la prueba preliminar, pero que en el análisis confirmatorio no se detectan los biomarcadores de exposición a cocaína y/o cannabinoides, como el caso de las muestras 16, 64 y 137, remarcan la importancia de los análisis confirmatorios. El preliminar positivo puede generarse por algún medicamento administrado o interferentes propios de la matriz, y en caso de no ser confirmado puede llevar a desviación en la orientación de la terapia, abordajes de casos e incluso sanciones de índole legal, dependiendo del escenario en que se realice el análisis.

Tabla 28 Resultados de las pruebas confirmatorias

COCAINA	GC/MS	CANNABINOIDES	GC/MS	COCAINA Y CANNABINOIDES	GC/MS
16	No detectado	64	No detectado	15	Grasa: No apto para análisis
36	Positivo	106	No detectado	76	BE positivo, THCA No detectado
43	Positivo	128	No detectado	81	BE y THCA positivo
44	No detectado	154	Positivo	122	THCA positivo, BE No detectado
54	Positivo	170	No detectado	137	BE y THCA No detectado
57	No detectado	171	Positivo	146	BE y THCA positivo
62	grasa	176	Positivo	305	BE positivo, THCA No detectado
75	No detectado	203	No detectado	306	THCA positivo, BE No detectado
94	No detectado	269	Positivo	127	No detectado

				(sanguinolenta)	
152	Positivo				
204	Positivo				
220	No detectado				
272	Positivo				
286	ND				

Dado que los resultados positivos de la prueba preliminar se determinan por la aparición de la línea de control y la ausencia de la línea correspondiente al analito, en algunos casos el resultado reportado puede variar dependiendo del analista. Cuando se generan falsos positivos, la confirmación permite descartar este tipo de resultados; sin embargo debido a esta misma inspección visual se pueden reportar falsos negativos como resultado final; por tanto es importante que la persona que aplica estas pruebas se encuentre entrenada y, de existir dudas, se pase a confirmación o se repita la prueba.

En las muestras 62 y 15 se observó la presencia de grasa, probablemente provenientes de desprendimiento de fracciones de placenta, las cuales debido a su afinidad por los solventes orgánicos no permitieron el análisis confirmatorio, pues no se recupera el estándar interno, aun cuando la muestra fue sometida a posteriores ciclos de centrifugación, filtración y extracción con el solvente.

Adicionalmente en el inserto del cup test empleado, se menciona que el pH y la densidad no generan interferencia y que no se conocen otros interferentes. Sin embargo, en la población en que se aplicó la prueba, algunas muestras de orina contenían fragmentos de placenta y sangre lo cual generó resultados no válidos en los inmunoensayos y no permitió la aplicación de la metodología confirmatoria; por tanto se recomienda el empleo de estas pruebas en una estancia previa al parto.

Para cocaína se tiene un punto de corte preliminar de 300 ng/mL (BE) y para THCA 50 ng/mL, sin embargo a pesar de que en el inserto se menciona una exactitud del 99.0%, en el apartado de sensibilidad se observa que el 50% de las muestras cuya concentración del analíto de interés se encuentra en el punto de corte no generan un resultado positivo, de tal manera que el valor predictivo positivo es del 50% a una concentración equivalente al punto de corte; adicionalmente el valor predictivo positivo a una concentración 25% sobre el punto de corte es de 80% y de 100% en una concentración equivalente al 50% sobre el punto de corte, lo cual puede generar falsos negativos frente a bajas concentraciones de los analítos de interés.

Aunque la literatura refiere al meconio como la matriz idónea para determinar exposición durante la gestación a drogas de abuso, los análisis acá realizados sugieren un aporte al seguimiento de los casos, pues demuestran el consumo de cocaína y cannabis por parte de las madres en días previos al parto.

Para una adecuada interpretación toxicológica se requiere de un enfoque multidisciplinario, por tanto los resultados han de ser sometidos a comparación con los hallazgos clínicos procedentes del proyecto “Alteraciones neurológicas en neonatos hijos de madres consumidoras de sustancias psicoactivas atendidos en el Hospital la Victoria sedes I y II de la Ciudad de Bogotá Colombia. 2014-.2015”, motivo por el cual se plantearon de manera conjunta.

6. CONCLUSIONES

- Se desarrolló y estandarizó una metodología analítica para la determinación simultánea de THCA y BE en orina por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como biomarcadores de exposición a cannabis y cocaína.

- La metodología analítica fue validada mediante los parámetros de desempeño recomendados por diferentes guías para la validación de metodologías bioanalíticas, correspondientes a linealidad, exactitud, precisión, estabilidad, límite de cuantificación y límite de detección; donde este último se encuentra acorde con los puntos de corte aceptados internacionalmente.
- En el presente trabajo se demostró que es posible el empleo rutinario de la metodología analítica por parte del Laboratorio de Toxicología de la Universidad Nacional de Colombia, de tal manera que se puede ofrecer el servicio a la población general, en los casos que sea pertinente y acorde con la legislación vigente, siendo así un aporte a la sociedad Colombiana.
- De las muestras de orina tomadas a 353 madres, 18 muestras generaron resultados positivos en el screening para cannabinoides y 23 para cocaína, de los cuales se confirmó la presencia de BE en 10 muestras y de THCA en 8 muestras, resultados que generan preocupación por las posibles consecuencias que acarrea el consumo de sustancias psicoactivas durante la gestación.

7. RECOMENDACIONES

El laboratorio de toxicología de la Universidad Nacional de Colombia cuenta con metodologías analíticas para la determinación de cocaína en material no biológico y en cabello; el análisis de drogas de abuso en otras matrices posee especial importancia, pues cada matriz aporta información específica con base en las ventanas de detección y metabolitos eliminados, por tanto se recomienda ampliar el análisis de drogas en otras matrices por parte del Laboratorio de Toxicología de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Complementar los resultados de este proyecto con los hallazgos clínicos de “Alteraciones neurológicas en neonatos hijos de madres consumidoras de sustancias psicoactivas atendidos en el Hospital la Victoria sedes I y II de la Ciudad de Bogotá Colombia. 2014-.2015” y “Características sociodemográficas de un grupo de mujeres gestantes consumidoras de drogas de abuso, atendidas en un hospital maternoinfantil de Bogotá, durante cinco meses del año 2015”.

Como se observa en el estudio de selectividad, la metodología analítica permite la detección de otras sustancias de potencial abuso, por lo tanto se recomienda continuar con la investigación y desarrollo de la metodología analítica con el fin de incrementar las sustancias de interés toxicológico que pueden ser sometidas a confirmación y generan un aporte a la sociedad.

Dado que la metodología analítica ofrece resultados cuantitativos, se recomienda su empleo con el fin de realizar estudios de eliminación de drogas de abuso.

Teniendo en cuenta que el desarrollo del análisis químico va de la mano con la tecnología, se recomienda la adquisición de nuevas tecnologías por parte del laboratorio con el fin de ampliar el portafolio en cuanto al análisis de drogas de abuso, que ofrezcan mayor sensibilidad y practicidad.

En los casos donde no se supervisa la toma de la muestra se recomienda realizar los análisis para verificar la integridad de las orinas, tales como densidad, pH, presencia de sustancias oxidantes entre otros.

Se recomienda realizar un seguimiento al área del estándar interno al emplear la metodología analítica para análisis rutinario, de tal manera que se pueda establecer su rango dinámico para establecer parámetros de calidad.

8. BIBLIOGRAFIA

AMA. (2015). *Código Mundial Antidopaje*. Agencia Mundial Antidopaje. Retrieved from <https://www.wada-ama.org/>

Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(23), 2224–2234. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030>

Azadi, A., & Dildy, G. A. (2008). Universal screening for substance abuse at the time of parturition. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(5), 30–32. <http://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.10.780>

Babor, T., Campbell, R., Room, R., & Saunders, J. (1994). Glosario de Términos de Alcohol y Drogas. *World Health*, 66. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Benavides, L., & Jaramillo, J. (2011). *Estandarización y validación de una metodología analítica por gc- ms para la determinación de cocaína, benzoilecgonina, ácido 11-nor-delta-9-tetrahidrocannabinol-9-carboxílico (thc- cooh) y 11-hidroxidelta-9-tetrahidrocannabinol (thc-Δ9) en muestras de*. Pereira.

Bertholf, R., & Winecker, R. (2007). *Chromatographic Methods in Clinical Chemistry and Toxicology*. John Wiley & Sons Ltd. <http://doi.org/10.1002/9780470023129>

Billings, K. E. (2003). Development of a Simple Method to Detect and Quantify Benzoylecgonine , a Cocaine Metabolite , in Urine. *Illinois Wesleyan University Digital Commons*.

Bogusz, M. (2000). *HANDBOOK OF ANALYTICAL SEPARATIONS*. (R. M. Smith, Ed.) *Forensic Science. Volumen 2*. Elsevier.

Bosque, J., Fernández, C., Huesca, R., & Díaz, D. (2013). El problema del consumo de cannabis : el papel del Sector Salud. *Salud Mental*, 36(2), 149–158.

Bouchene, S., Sadeg, N., & Belhadj-tahar, H. (2013). New extraction method of THC and its metabolites , 11-OH-THC and THC-COOH in plasma. *Ann Toxicol Anal.*, 25(November 2011), 1–5.

Chang, G. (2014). Screening for alcohol and drug use during pregnancy. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 41(2), 205–212. <http://doi.org/10.1016/j.ogc.2014.02.002>

Cressman, A. M., Natekar, A., Kim, E., Koren, G., & Bozzo, P. (2014). Cocaine Abuse During Pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can*, 36(7), 628–631. [http://doi.org/10.1016/S1701-2163\(15\)30543-0](http://doi.org/10.1016/S1701-2163(15)30543-0)

Damin, C., & Grau, G. (2015). Toxicología Actualización Cocaína. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(1), 127–134. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v49n1/v49n1a12.pdf>

- Dasgupta, A. (2008). *Handbook of Drug Monitoring Methods*. Humana Press.
- Desrosiers, N., Lee, D., & Scheidweiler, K. (2014). In Vitro Stability of Free and Glucuronidated Cannabinoids in Urine Following Controlled Smoked Cannabis. *Anal Bioanal Chem.*, 406(3), 785–792. <http://doi.org/10.1016/j.str.2010.08.012>.Structure
- Eichel, M. M., & Johannemann, T. R. (2014). Implementation of universal maternal drug screening to identify neonatal abstinence syndrome candidates. *Newborn and Infant Nursing Reviews*, 14(1), 17–22. <http://doi.org/10.1053/j.nainr.2013.12.004>
- El Congreso de Colombia. (1986). LEY 30 DE 1986.
- Elsohly, M. A., & Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana : The complex mixture of natural cannabinoids, 78, 539–548. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.011>
- Escobar Toledo, I. E., Berrouet Mejía, C. M., & González Ramírez, D. M. (2009). Mecanismos moleculares de la adicción a la marihuana. *Rev Colomb Psiquiat*, 38(1), 126–142.
- Eurachem. (1998). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. Eurachem Guide*, ISBN: 0-94948926-12-0. <http://doi.org/978-91-87461-59-0>
- Flanagan, R., & Taylor, A. (2007). *Fundamentals of Analytical Toxicology. Anal. Chem.* (Vol. 398). <http://doi.org/10.1007/s00216-010-3971-6>
- Food and Drug Administration. (2013). Guidance for industry. Bioanalytical method validation., (September). Retrieved from <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf>
- Fu, S., & Lewis, J. (2008). Novel automated extraction method for quantitative analysis of urinary 11-nor-delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH). *Journal of Analytical Toxicology*, 32(4), 292–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18430296>
- Gonzales, E., Ng, G., Pesce, A., West, C., West, R., Mikel, C., ... Almazan, P. (2013). Stability of pain-related medications, metabolites, and illicit substances in urine. *Clinica Chimica Acta*, 416, 80–85. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2012.11.020>
- Groves, M., & Dean, J. (2013). *Forensic Applications of Pyrolysis – Gas Chromatography*. CRC Press.
- Hippenstiel, M. J., Gerson, B., St, T., & St, E. C. (1994). Optimization of storage conditions for cocaine and benzoylecgonine in urine: a review. *Journal of Analytical Toxicology*, 18(2), 104–109.
- ICH. (2005). ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. *International Conference on Harmonization, 1994*(November 1996), 17. http://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
- Idaho State Police. (n.d.). Liquid-Liquid Extraction Methods for GC/MSD Confirmation. *Toxicology Discipline Analytical Method Section*, (2-12-13), 1–8.

- Karch, S. (2009). *Karch's Pathology of drug abuse. PhD Proposal* (Vol. 1). CRC Press. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Kuczkowski, K. M. (2002). Cocaine abuse in pregnancy – anesthetic implications. *International Journal of Obstetric Anesthesia*, 11(3), 204–210. <http://doi.org/10.1054/ijoa.2002.0960>
- Lizasoain, I., Moro, M. A., & Lorenzo, P. (2002). Cocaina: Aspectos farmacológicos. *Adicciones*.
- Lundanes, E., Reubsaet, L., & Greibrokk, T. (2013). *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*. Retrieved from <http://books.google.co.uk/books/about/Chromatography.html?id=NW9wAAAAQBAJ&pgis=1>
- Metz, T. D., & Stickrath, E. H. (2015). Marijuana use in pregnancy and lactation: a review of the evidence. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213(6), 761–78. <http://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.025>
- Ministerio de salud. (1993). Resolucion 8430 de 1993 - 1. *Republica de Colombia Ministerio de Salud*, 1993, 1–12. <http://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080023>
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2015). Decreto 2467 de 2015.
- Minto, C. F., Schnider, T. W., & Shafer, S. L. (1997). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of cannabinoids. *Anesthesiology*, 86(4), 24–33.
- Morales, A., DiBernadro, M., Luna, J., & Garcia, Ma. (2003). Estudio de estabilidad y determinación de metabolitos de cocaína y marihuana en fluidos biológicos. *Revista de La Facultad de Medicina*, 19–29.
- Needleman, S. B., Goodin, K., & Severino, W. (1991). Liquid-liquid extraction systems for THC-COOH and benzoylecgonine. *J Anal Toxicol*, 15(4), 179–181. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1658491
- Negrusz, A., & Cooper, G. (Eds.). (2015). *Clarke's Analytical Forensic Toxicology. PhD Proposal* (Second Edi, Vol. 1). Pharmaceutical Press. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- NSW Department of Health. (2006). National clinical guidelines for the management of drug use during pregnancy, birth and the early development years of the newborn. Retrieved from [http://www.health.act.gov.au/sites/default/files/Clinical Guidelines - Drug Use During Pregnancy, Birth, Early Development.pdf](http://www.health.act.gov.au/sites/default/files/Clinical%20Guidelines%20-%20Drug%20Use%20During%20Pregnancy,%20Birth,%20Early%20Development.pdf)
- NTC-ISO-17025. (2005). Norma Técnica Colombiana Icontec. “Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibración. Icontec Editor.
- Obervatorio de Drogas de Colombia. (2014). Estudio Nacional de Consumo de Sustancias Psicoactivas en Colombia 2013, 180. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Observatorio de Drogas de Colombia. (2015). Reporte de drogas de Colombia 2015. Retrieved from http://www.odc.gov.co/Portals/1/publicaciones/pdf/odc-libro-blanco/OD0100311215_reporte_de_drogas_de_colombia.pdf
- OEA. (2013a). Drogas y Salud Pública. *El Problema de Las Drogas En Las Americas:*

Estudios, 79.

- OEA. (2013b). *El Problema de Drogas en las Américas: Alternativas Legales y Regulatorias*. Retrieved from http://www.cicad.oas.org/drogas/elinforme/informeDrogas2013/alternativasLegales_ESP.pdf
- OEA. (2013c). *El problema de la drogas en las Américas*. Retrieved from http://www.odc.gov.co/Portals/1/publicaciones/pdf/destacados/CO031052013-OEAS_drogas_americas_informe.pdf
- Olson, K. (Ed.). (2006). *Poisoning & Drug Overdose* (Quinta ed.). McGrawHill.
- Rabelo, M. (2010). *Desenvolvimento e validação de metodologia para análise de cocaína, derivados e metabólitos em amostras de meconio utilizando a Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas*.
- Rozet, E., Ceccato, A., Hubert, C., Ziemons, E., Oprean, R., Rudaz, S., ... Hubert, P. (2007). Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A*, 1158(1-2), 111–125. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.111>
- Sabogal, J. S. (2010). *DETERMINACION DE LA COMPOSICION QUIMICA DE DROGAS DE ABUSO INCAUTADAS EN COLOMBIA DURANTE EL PRIMER SEMESTRE DE 2010: FASE I COCAINA EN MUESTRAS DE BASUCO PROCEDENTES DEL LABORATORIO DE ESTUPEFACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS F*. Universidad Nacional de Colombia. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sabogal, J. S. (2015). Composición química de las diferentes variedades de cannabis. In J. Téllez Mosquera (Ed.), *Marihuana cannabis, Aspectos toxicológicos, clínicos, sociales y potenciales usos terapéuticos* (pp. 123–133). Bogotá: AF&M Producciones gráficas.
- Sabogal, J. S., & Pulido, J. H. (2015). Análisis toxicológico de cannabis en muestras biológicas. Pruebas preliminares y confirmatorias. In J. A. Téllez Mosquera (Ed.), *Marihuana cannabis, Aspectos toxicológicos, clínicos, sociales y potenciales usos terapéuticos* (pp. 217–234). Bogotá: AF&M Producciones gráficas.
- SAMHSA. (2008). *Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs. Federal Register* (Vol. 73). Retrieved from <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2008-11-25/pdf/E8-26726.pdf>
- SAMHSA. (2012). *Clinical Drug Testing in Primary Care*. (Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Ed.) *Technical Assistance Publication (TAP) 32*.
- Skoog, D., & Holler, F. J. (1992). *Principios De Análisis Instrumental* (Quinta ed.). McGrawHill.
- Skopp, G., & Potech, L. (2004). An investigation of the stability of free and glucuronidated 11-nor-delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in authentic urine samples. *J Anal Toxicol*, 28(1), 35–40. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14987422
- SOFT, & AAFS. (2006). Forensic toxicology laboratory guidelines., 23(7). Retrieved from http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf

- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). GC y GC-MS : configuración del equipo versus aplicaciones. *Scientia Chromatographica*, 2(3), 33–59. Retrieved from <http://www.scientiachromatographica.com/files/v2n3/v2n3a3.pdf>
- SWGTOX. (2013). Scientific working group for forensic toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), 452–474. <http://doi.org/10.1093/jat/bkt054>
- Téllez, J., & Cote, M. (2005). Efectos Toxicológicos y Neuropsiquiátricos Producidos por Consumo de Cocaína. *Rev.fac.med.unal*, 53(1), 10–26. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-00112005000100003&script=sci_arttext
- Téllez Mosquera, J. A., & Bedoya Chavarriaga, J. C. (2015). Dosis personal de drogas: inconsistencias técnico-científicas en la legislación y la jurisprudencia colombiana. *Persona Y Bioética*, 19(1), Roncero, C., Egido, A., Pérez–pazos, J., & Collazo. <http://doi.org/10.5294/pebi.2015.19.1.8>
- The United States Pharmacopeial Convention. (2006). *USP 29 Farmacopea de los estados Unidos de America* (Edición 29). Canadá.
- UNODC. (2013). *Análisis Forense de sustancias que facilitan la agresión sexual y otros actos delictivos*.
- Vallejo, M. (2012). Determinación de cocaína en cabello como biomarcador de consumo crónico , mediante GC-MS. *Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología*, 1–97.
- Vargas, K. G. (2011). REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA COCAÍNA : ACTUALIZACIÓN MÉDICO LEGAL, 28(2), 57–62.
- Wanner, K., & Hofner, G. (Eds.). (2015). *Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry, Applications in drug discovery. PhD Proposal* (Vol. 36). Wiley-VCH. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Wong, S., Ordean, a, Kahan, M., Maternal Fetal Medicine, C., Family Physicians Advisory, C., Medico-Legal, C., ... Gynaecologists of, C. (2011). Substance use in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can*, 33(4), 367–384. <http://doi.org/10.1093/tropej/fmr079>
- Yuan, C., Chen, D., & Wang, S. (2015). Drug confirmation by mass spectrometry: Identification criteria and complicating factors. *Clinica Chimica Acta*, 438, 119–125. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2014.08.021>

ANEXOS

Anexo 1 Resultados curva de calibración 1 en método.

METODO 1									
Compound 3: be					Compound 1: be d3				
Concentracion ug/mL	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	relacion analito/IS
0,15	1	75A	6,586	21119	1	75A	6,583	20618	1,02429916
0,15	2	75B	6,584	32544	2	75B	6,575	24819	1,31125348
0,15	3	75C	6,586	69387	3	75C	6,577	51950	1,33564966
0,15	4	75D	6,585	44486	4	75D	6,574	39576	1,12406509
0,2	6	100A	6,585	61217	6	100A	6,575	34601	1,76922632
0,2	7	100B	6,585	58254	7	100B	6,571	32451	1,79513728
0,2	8	100C	6,584	83224	8	100C	6,575	44834	1,8562698
0,2	9	100D	6,583	95589	9	100D	6,575	45581	2,0971238
0,2	10	100E	6,582	76335	10	100E	6,574	37856	2,0164571
0,25	11	125A	6,582	90341	11	125A	6,574	35155	2,56979093
0,25	12	125B	6,583	83597	12	125B	6,574	32241	2,59287863
0,25	13	125C	6,583	98032	13	125C	6,574	42522	2,30544189
0,25	14	125D	6,583	104576	14	125D	6,574	42535	2,45858705
0,25	15	125E	6,587	120442	15	125E	6,579	52932	2,27540996
0,3	16	150A	6,583	119359	16	150A	6,576	33424	3,57105673
0,3	17	150B	6,581	98468	17	150B	6,568	31900	3,08677116
0,3	18	150C	6,583	99034	18	150C	6,577	29684	3,33627543
0,3	19	150D	6,582	117366	19	150D	6,575	34034	3,44849268
0,3	20	150E	6,581	106331	20	150E	6,572	30125	3,52965975
0,35	21	175A	6,581	131580	21	175A	6,572	30761	4,27749423
0,35	22	175B	6,583	132017	22	175B	6,573	35400	3,72929379
0,35	23	175C	6,581	111464	23	175C	6,571	29250	3,81073504
0,35	24	175D	6,583	111056	24	175D	6,574	27480	4,04133916
0,35	25	175E	6,58	163248	25	175E	6,571	42155	3,87256553
Compound 4: thca					Compound 2: thca d3				
Concentracion ug/mL	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	relacion analito/IS
0,0225	1	75A	8,849	59984	1	75A	8,822	34183	1,75479039
0,0225	3	75C	8,842	66017	3	75C	8,826	34940	1,88943904
0,0225	4	75D	8,842	32260	4	75D	8,826	16977	1,90021794
0,0225	5	75E	8,842	76858	5	75E	8,823	49147	1,56383909
0,03	6	100A	8,827	8787	6	100A	8,823	4273	2,05640066
0,03	7	100B	8,842	28205	7	100B	8,819	13242	2,12996526
0,03	8	100C	8,845	51439	8	100C	8,825	23631	2,17675934
0,03	9	100D	8,835	10304	9	100D	8,821	4869	2,11624564
0,03	10	100E	8,835	6078	10	100E	8,832	3204	1,89700375
0,0375	11	125A	8,839	126158	11	125A	8,822	45713	2,75978387
0,0375	12	125B	8,84	99288	12	125B	8,819	35377	2,80656924
0,0375	13	125C	8,837	16791	13	125C	8,819	6865	2,44588492
0,0375	14	125D	8,84	12015	14	125D	8,821	4704	2,55420918
0,0375	15	125E	8,853	128519	15	125E	8,839	45487	2,82540066
0,045	16	150A	8,839	100889	16	150A	8,822	32597	3,09503942
0,045	17	150B	8,835	71054	17	150B	8,82	22545	3,15165225
0,045	18	150C	8,837	55180	18	150C	8,819	16888	3,26740881
0,045	19	150D	8,838	62500	19	150D	8,823	21285	2,93634015
0,045	20	150E	8,836	93506	20	150E	8,816	28798	3,24696159
0,0525	21	175A	8,835	32684	21	175A	8,81	9236	3,53876137
0,0525	22	175B	8,837	307965	22	175B	8,818	81814	3,76420906
0,0525	23	175C	8,831	13378	23	175C	8,812	3814	3,50760357
0,0525	24	175D	8,84	13634	24	175D	8,815	3812	3,57660021

Anexo 2 Resultados curva de calibración 2 en método

METODO 2									
Compound 3: be					Compound 1: bed3				
Concentracion ug/mL	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	relacion analito/IS
0,15	1	75A2	6,576	7203	1	75A2	6,568	4056	1,77588757
0,15	2	75B2	6,577	13477	2	75B2	6,568	8462	1,59264949
0,15	3	75C2	6,578	23802	3	75C2	6,569	14958	1,59125552
0,15	4	75D2	6,577	15255	4	75D2	6,568	10939	1,3945516
0,2	6	100A2	6,578	22305	6	100A2	6,568	10718	2,08107856
0,2	7	100B2	6,577	19351	7	100B2	6,568	10124	1,91139866
0,2	8	100C2	6,578	34613	8	100C2	6,569	15378	2,25081285
0,2	9	100D2	6,578	31046	9	100D2	6,568	16116	1,92640854
0,2	10	1,00E+04	6,577	23540	10	1,00E+04	6,569	11181	2,1053573
0,25	11	125A2	6,577	41512	11	125A2	6,569	14378	2,88718876
0,25	12	125B2	6,577	31911	12	125B2	6,569	10659	2,99380805
0,25	13	125C2	6,577	33748	13	125C2	6,568	12613	2,6756521
0,25	14	125D2	6,578	37373	14	125D2	6,569	15182	2,46166513
0,25	15	1,25E+04	6,586	37698	15	1,25E+04	6,574	14803	2,54664595
0,3	16	150A2	6,58	36212	16	150A2	6,571	12274	2,95030145
0,3	17	150B2	6,579	34086	17	150B2	6,567	10869	3,13607508
0,3	18	150C2	6,578	29469	18	150C2	6,569	9006	3,2721519
0,3	19	150D2	6,579	42792	19	150D2	6,57	12804	3,3420806
0,3	20	1,50E+04	6,579	40122	20	1,50E+04	6,571	12766	3,14287952
0,35	21	175A2	6,58	45836	21	175A2	6,572	10698	4,28453917
0,35	22	175B2	6,581	47929	22	175B2	6,571	12373	3,87367655
0,35	23	175C2	6,579	39030	23	175C2	6,57	10085	3,87010412
0,35	25	1,75E+04	6,579	57035	25	1,75E+04	6,569	13949	4,08882357
Compound 4: thca					Compound 2: thcad3				
Concentracion ug/mL	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	relacion analito/IS
0,0225	1	75A2	8,828	19746	1	75A2	8,811	11654	1,69435387
0,0225	2	75B2	8,829	2074	2	75B2	8,812	1497	1,38543754
0,0225	3	75C2	8,827	22745	3	75C2	8,81	14956	1,52079433
0,0225	4	75D2	8,826	10752	4	75D2	8,81	6110	1,75973813
0,0225	5	7,50E+03	8,828	26336	5	7,50E+03	8,808	16002	1,64579428
0,03	6	100A2	8,828	3096	6	100A2	8,808	1430	2,16503497
0,03	7	100B2	8,827	8490	7	100B2	8,814	4165	2,03841537
0,03	8	100C2	8,827	17373	8	100C2	8,81	8509	2,04172053
0,03	9	100D2	8,825	3735	9	100D2	8,813	1643	2,27328058
0,03	10	1,00E+04	8,832	2618	10	1,00E+04	8,813	1123	2,33125557
0,0375	11	125A2	8,828	42632	11	125A2	8,808	15813	2,69600961
0,0375	12	125B2	8,828	34088	12	125B2	8,809	12148	2,80605861
0,0375	13	125C2	8,824	5947	13	125C2	8,806	2286	2,60148731
0,0375	14	125D2	8,826	6861	14	125D2	8,81	2359	2,90843578
0,0375	15	1,25E+04	8,849	58760	15	1,25E+04	8,833	18543	3,16885078
0,045	16	150A2	8,83	35686	16	150A2	8,811	10667	3,34545795
0,045	17	150B2	8,832	22610	17	150B2	8,813	6791	3,32940657
0,045	18	150C2	8,83	20201	18	150C2	8,81	6223	3,24618351
0,045	19	150D2	8,828	20383	19	150D2	8,812	6454	3,15819647
0,045	20	1,50E+04	8,828	31036	20	1,50E+04	8,81	9697	3,2005775
0,0525	21	175A2	8,832	10641	21	175A2	8,812	2656	4,0064006
0,0525	22	175B2	8,834	83439	22	175B2	8,813	22912	3,64171613
0,0525	23	175C2	8,829	5217	23	175C2	8,816	1437	3,63048017
0,0525	24	175D2	8,831	6888	24	175D2	8,815	1814	3,79713341

Anexo 3 Resultados curva de calibración 3 en método

METODO 3									
Compound 3: be					Compound 1: bed3				
Concentracion ug/mL	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	relacion analito/IS
0,15	1	75A3	6,575	62152	1	75A3	6,565	40174	1,54707024
0,15	2	75B3	6,575	20168	2	75B3	6,567	13699	1,47222425
0,15	3	75C3	6,575	48115	3	75C3	6,566	28047	1,71551325
0,15	4	75D3	6,576	51577	4	75D3	6,567	35739	1,44315734
0,15	5	7,50E+04	6,574	37836	5	7,50E+04	6,569	28206	1,34141672
0,2	6	100A3	6,58	56096	6	100A3	6,574	29513	1,90072172
0,2	7	100B3	6,579	61507	7	100B3	6,568	34504	1,78260492
0,2	9	100D3	6,577	54209	9	100D3	6,567	27387	1,97936977
0,2	10	1,00E+05	6,577	61190	10	1,00E+05	6,568	30212	2,02535416
0,25	11	125A3	6,58	75158	11	125A3	6,57	28413	2,64519762
0,25	12	125B3	6,578	69146	12	125B3	6,571	24959	2,77038343
0,25	13	125C3	6,578	70894	13	125C3	6,57	30794	2,30220173
0,25	14	125D3	6,578	84138	14	125D3	6,568	31439	2,67623016
0,25	15	1,25E+05	6,579	94400	15	1,25E+05	6,568	38561	2,44806929
0,3	16	150A3	6,581	88342	16	150A3	6,573	30993	2,85038557
0,3	17	150B3	6,579	73456	17	150B3	6,569	23729	3,09562139
0,3	18	150C3	6,578	77148	18	150C3	6,568	22877	3,37229532
0,3	19	150D3	6,58	78767	19	150D3	6,57	26823	2,93654699
0,3	20	1,50E+05	6,582	78767	20	1,50E+05	6,573	26627	2,95816277
0,35	21	175A3	6,58	95629	21	175A3	6,569	25240	3,78878764
0,35	22	175B3	6,579	101074	22	175B3	6,57	26990	3,74486847
0,35	23	175C3	6,579	101680	23	175C3	6,568	28350	3,58659612
0,35	24	175D3	6,583	98731	24	175D3	6,572	25832	3,82204243
Compound 4: thca					Compound 2: thcad3				
Concentracion ug/mL	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	relacion analito/IS
0,0225	1	75A3	8,823	41658	1	75A3	8,804	26618	1,56503118
0,0225	3	75C3	8,821	6936	3	75C3	8,806	4642	1,49418354
0,0225	4	75D3	8,823	27271	4	75D3	8,809	19529	1,39643607
0,0225	5	7,50E+04	8,823	2637	5	7,50E+04	8,814	1753	1,50427838
0,03	6	100A3	8,827	74336	6	100A3	8,807	35192	2,11229825
0,03	7	100B3	8,827	9187	7	100B3	8,814	4437	2,07054316
0,03	8	100C3	8,829	8379	8	100C3	8,819	3573	2,34508816
0,03	9	100D3	8,826	49589	9	100D3	8,808	24203	2,04887824
0,03	10	1,00E+05	8,829	52902	10	1,00E+05	8,813	24146	2,19092189
0,0375	11	125A3	8,833	106552	11	125A3	8,809	37026	2,87776157
0,0375	12	125B3	8,827	26219	12	125B3	8,807	9916	2,64411053
0,0375	13	125C3	8,829	93270	13	125C3	8,812	35207	2,64918908
0,0375	14	125D3	8,828	91319	14	125D3	8,811	30480	2,99603018
0,0375	15	1,25E+05	8,829	110191	15	1,25E+05	8,812	37604	2,93029997
0,045	16	150A3	8,829	115459	16	150A3	8,812	33247	3,47276446
0,045	18	150C3	8,829	18047	18	150C3	8,811	5301	3,40445199
0,045	19	150D3	8,83	12204	19	150D3	8,809	3765	3,24143426
0,045	20	1,50E+05	8,838	89804	20	1,50E+05	8,817	25065	3,5828446
0,0525	21	175A3	8,83	25404	21	175A3	8,813	5994	4,23823824
0,0525	22	175B3	8,831	108204	22	175B3	8,816	26737	4,0469761
0,0525	23	175C3	8,829	30250	23	175C3	8,811	8257	3,66355819
0,0525	24	175D3	8,833	195212	24	175D3	8,817	50977	3,82941326
0,0525	25	1,75E+05	8,828	61000	25	1,75E+05	8,811	16954	3,59797098

Anexo 4 Resultados curva de calibración 4 en método

METODO 4									
Compound 3: be					Compound 1: be d3				
Concentración ug/mL	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	relacion analito/IS
0,15	1	75a4	6,575	48203	1	75a4	6,567	31288	1,5406226
0,15	2	75b4	6,574	38329	2	75b4	6,567	25496	1,50333386
0,15	3	75c4	6,575	37110	3	75c4	6,566	23775	1,56088328
0,15	4	75d4	6,574	37575	4	75d4	6,566	24441	1,53737572
0,15	5	7,50E+05	6,577	27194	5	7,50E+05	6,567	18774	1,4484926
0,2	6	100a4	6,578	39859	6	100a4	6,57	20335	1,96011802
0,2	7	100b4	6,578	45465	7	100b4	6,569	24792	1,8338577
0,2	8	100c4	6,577	38070	8	100c4	6,569	20606	1,84752014
0,2	9	100d4	6,575	45774	9	100d4	6,567	21810	2,09876204
0,2	10	1,00E+06	6,575	49623	10	1,00E+06	6,567	23579	2,10454218
0,25	11	125a4	6,578	56260	11	125a4	6,57	23609	2,38298954
0,25	12	125b4	6,577	50985	12	125b4	6,567	18775	2,71557923
0,25	13	125c4	6,579	51100	13	125c4	6,569	21741	2,35039787
0,25	14	125d4	6,577	61354	14	125d4	6,566	23002	2,66733328
0,25	15	1,25E+06	6,577	62049	15	1,25E+06	6,569	23552	2,63455333
0,3	16	150a4	6,581	72411	16	150a4	6,571	21960	3,29740437
0,3	17	150b4	6,576	75679	17	150b4	6,567	21178	3,57347247
0,3	18	150c4	6,578	65359	18	150c4	6,569	19707	3,31653727
0,3	19	150d4	6,577	69929	19	150d4	6,568	20085	3,48165297
0,3	20	1,50E+06	6,581	54937	20	1,50E+06	6,57	16568	3,31584983
0,35	21	175a4	6,579	60697	21	175a4	6,569	15069	4,02793815
0,35	22	175b4	6,578	74847	22	175b4	6,57	20608	3,63193905
0,35	23	175c4	6,576	74587	23	175c4	6,567	17987	4,14671707
0,35	24	175d4	6,581	75231	24	175d4	6,572	21083	3,56832519
0,35	25	1,75E+06	6,577	60888	25	1,75E+06	6,568	15364	3,96303046
Compound 4: thca					Compound 2: thca d3				
Concentración ug/mL	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	relacion analito/IS
0,0225	1	75a4	8,825	35413	1	75a4	8,804	23315	1,51889342
0,0225	2	75b4	8,824	43685	2	75b4	8,805	25692	1,70033473
0,0225	3	75c4	8,819	5121	3	75c4	8,802	2918	1,75496916
0,0225	4	75d4	8,823	20656	4	75d4	8,807	13645	1,51381458
0,0225	5	7,50E+05	8,821	3158	5	7,50E+05	8,799	1780	1,7741573
0,03	6	100a4	8,825	63622	6	100a4	8,806	28244	2,25258462
0,03	7	100b4	8,825	8370	7	100b4	8,804	3873	2,16111541
0,03	8	100c4	8,822	9260	8	100c4	8,807	4206	2,20161674
0,03	9	100d4	8,822	39135	9	100d4	8,807	19369	2,02049667
0,03	10	1,00E+06	8,822	41207	10	1,00E+06	8,802	17611	2,33984442
0,0375	11	125a4	8,829	81121	11	125a4	8,81	27161	2,98667207
0,0375	12	125b4	8,825	20224	12	125b4	8,804	6949	2,91034681
0,0375	13	125c4	8,827	72615	13	125c4	8,81	25184	2,88337834
0,0375	14	125d4	8,826	61587	14	125d4	8,807	23932	2,57341635
0,0375	15	1,25E+06	8,827	85482	15	1,25E+06	8,808	28598	2,98909015
0,045	16	150a4	8,826	81705	16	150a4	8,809	25080	3,25777512
0,045	17	150b4	8,823	46683	17	150b4	8,806	13618	3,42803642
0,045	18	150c4	8,824	8957	18	150c4	8,808	2790	3,21039427
0,045	20	1,50E+06	8,833	64121	20	1,50E+06	8,813	20748	3,09046655
0,0525	21	175a4	8,826	16578	21	175a4	8,81	4452	3,72371968
0,0525	22	175b4	8,825	79502	22	175b4	8,807	22353	3,55665906
0,0525	23	175c4	8,821	20677	23	175c4	8,809	5650	3,65964602
0,0525	24	175d4	8,828	152760	24	175d4	8,811	39082	3,90870477
0,0525	25	1,75E+06	8,83	9722	25	1,75E+06	8,8	2401	4,04914619

Anexo 5 Resultados curva de calibración 5 en método

METODO 5									
Compound 3: be					Compound 1: bed3				
Concentracion ug/mL	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	relacion analito/IS
0,15	1	75a	6,58	56269	1	75a	6,571	32596	1,72625476
0,15	2	75b	6,577	37018	2	75b	6,57	26851	1,37864512
0,15	3	75c	6,578	35170	3	75c	6,57	21581	1,62967425
0,15	4	75d	6,578	35828	4	75d	6,567	23481	1,52582939
0,15	5	75e	6,578	29658	5	75e	6,567	17347	1,70969044
0,2	6	100a	6,581	41588	6	100a	6,572	21512	1,93324656
0,2	7	100b	6,577	43045	7	100b	6,568	24723	1,74109129
0,2	8	100c	6,578	40183	8	100c	6,57	21378	1,87964262
0,2	10	100e	6,577	51941	10	100e	6,569	24594	2,11193787
0,25	11	125a	6,581	52967	11	125a	6,571	19943	2,65591937
0,25	12	125b	6,579	49664	12	125b	6,569	21050	2,35933492
0,25	13	125c	6,58	51404	13	125c	6,573	20038	2,56532588
0,25	15	125e	6,579	68528	15	125e	6,569	24776	2,76590249
0,3	16	150a	6,582	69265	16	150a	6,571	19778	3,50212357
0,3	17	150b	6,578	78473	17	150b	6,57	23103	3,39665844
0,3	19	150d	6,579	65426	19	150d	6,57	18764	3,4867832
0,3	20	150e	6,582	59943	20	150e	6,573	19077	3,14216072
0,35	22	175b	6,577	73047	22	175b	6,569	18633	3,92030269
0,35	23	175c	6,578	70899	23	175c	6,568	17377	4,08004834
0,35	24	175d	6,582	78130	24	175d	6,573	18427	4,23997395
0,35	25	175e	6,579	61786	25	175e	6,571	15432	4,00375842
Compound 4: thca					Compound 2: thcad3				
Concentracion ug/mL	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	relacion analito/IS
0,0225	1	75a	8,827	46023	1	75a	8,807	24858	1,85143616
0,0225	2	75b	8,825	40489	2	75b	8,807	24493	1,65308455
0,0225	3	75c	8,817	6225	3	75c	8,804	4821	1,29122589
0,0225	4	75d	8,824	20644	4	75d	8,804	13344	1,54706235
0,0225	5	75e	8,818	2795	5	75e	8,798	1633	1,71157379
0,03	6	100a	8,826	62427	6	100a	8,808	31017,6	2,01263154
0,03	7	100b	8,825	8464	7	100b	8,81	3688,8	2,29451312
0,03	8	100c	8,827	7126	8	100c	8,808	3232,8	2,20428112
0,03	9	100d	8,825	40236	9	100d	8,807	21597,6	1,86298478
0,03	10	100e	8,826	41284	10	100e	8,808	21170,4	1,95008125
0,0375	11	125a	8,832	70325	11	125a	8,813	28755	2,44566162
0,0375	12	125b	8,823	17180	12	125b	8,81	6785	2,53205601
0,0375	13	125c	8,827	69120	13	125c	8,808	25900	2,66872587
0,0375	14	125d	8,826	65232	14	125d	8,804	23111	2,82255203
0,0375	15	125e	8,826	88027	15	125e	8,807	30261	2,90892568
0,045	16	150a	8,826	85339	16	150a	8,807	27537	3,09906671
0,045	17	150b	8,826	47449	17	150b	8,807	14817	3,20233516
0,045	18	150c	8,823	11356	18	150c	8,806	3684	3,082519
0,045	19	150d	8,826	10082	19	150d	8,805	3421	2,94709149
0,045	20	150e	8,83	74112	20	150e	8,813	22980	3,22506527
0,0525	22	175b	8,826	80220	22	175b	8,806	22033	3,64090228
0,0525	23	175c	8,824	19333	23	175c	8,809	5404	3,57753516
0,0525	24	175d	8,829	141465	24	175d	8,81	36810	3,84311328
0,0525	25	175e	8,831	9931	25	175e	8,81	2500	3,9724

Anexo 6 Resultados curva de calibración en sistema

SISTEMA									
Compound 3: be					Compound 1: be d3				
Concentracion ug/mL	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	relacion analito/IS
0,15	1	75asistema	6,578	218364	1	75asistema	6,57	152154	1,43515123
0,15	2	75bsistema	6,577	249509	2	75bsistema	6,568	171616	1,45387959
0,15	3	75csistema	6,577	249252	3	75csistema	6,567	195810	1,27292784
0,15	4	75dsistema	6,577	292835	4	75dsistema	6,567	180215	1,62492023
0,15	5	75esistema	6,578	255044	5	75esistema	6,568	182625	1,39654483
0,2	6	100asistema	6,578	383871	6	100asistema	6,568	185830	2,0657106
0,2	7	100bsistema	6,578	364695	7	100bsistema	6,568	179307	2,0339139
0,2	8	100csistema	6,58	440589	8	100csistema	6,569	182502	2,41415984
0,2	9	100dsistema	6,579	424727	9	100dsistema	6,569	164363	2,58407914
0,2	10	100esistema	6,578	379341	10	100esistema	6,567	174505	2,17381164
0,25	11	125asistema	6,58	474320	11	125asistema	6,568	156969	3,02174315
0,25	12	125bsistema	6,578	488639	12	125bsistema	6,567	162484	3,00730533
0,25	13	125csistema	6,58	446185	13	125csistema	6,568	150323	2,9681752
0,25	14	125dsistema	6,579	501877	14	125dsistema	6,567	174746	2,87203713
0,25	15	125esistema	6,579	376460	15	125esistema	6,568	137322	2,74143983
0,3	16	150asistema	6,578	564390	16	150asistema	6,567	151542	3,72431405
0,3	17	150bsistema	6,579	591501	17	150bsistema	6,567	152607	3,87597555
0,3	18	150csistema	6,581	656621	18	150csistema	6,566	145987	4,4978046
0,3	19	150dsistema	6,578	553173	19	150dsistema	6,567	147122	3,75996112
0,35	20	175asistema	6,581	675042	20	175asistema	6,568	143376	4,70819384
0,35	21	175bsistema	6,58	752990	21	175bsistema	6,567	150622	4,9992033
0,35	22	175csistema	6,58	618946	22	175csistema	6,568	128946	4,80004033
0,35	23	175dsistema	6,58	741161	23	175dsistema	6,568	156752	4,72823951
0,35	24	175esistema	6,58	700501	24	175esistema	6,568	139575	5,01881426
Compound 4: thca					Compound 2: thca d3				
Concentracion ug/mL	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	Line#	Sample ID	Ret. Time	Area	relacion analito/IS
0,0225	1	75asistema	8,823	104330	1	75asistema	8,805	75780	1,37674848
0,0225	2	75bsistema	8,821	117790	2	75bsistema	8,803	77701	1,51593931
0,0225	3	75csistema	8,821	118054	3	75csistema	8,803	91864	1,28509536
0,0225	4	75dsistema	8,822	126995	4	75dsistema	8,802	95918	1,3239955
0,0225	5	75esistema	8,823	118046	5	75esistema	8,804	78304	1,50753474
0,03	6	100asistema	8,823	166418	6	100asistema	8,801	85871	1,93800002
0,03	7	100bsistema	8,822	157962	7	100bsistema	8,803	86465	1,82688949
0,03	8	100csistema	8,822	167959	8	100csistema	8,801	84768	1,98139628
0,03	9	100dsistema	8,821	163579	9	100dsistema	8,801	84760	1,92990798
0,03	10	100esistema	8,822	152596	10	100esistema	8,802	83094	1,83642622
0,0375	11	125asistema	8,823	212313	11	125asistema	8,804	93216	2,27764547
0,0375	12	125bsistema	8,819	209182	12	125bsistema	8,8	85343	2,4510739
0,0375	13	125csistema	8,823	196262	13	125csistema	8,803	85411	2,29785391
0,0375	14	125dsistema	8,821	207044	14	125dsistema	8,801	79335	2,60974349
0,0375	15	125esistema	8,821	188625	15	125esistema	8,802	82259	2,29306216
0,045	16	150asistema	8,819	205440	16	150asistema	8,8	70706	2,90555257
0,045	17	150bsistema	8,819	256314	17	150bsistema	8,801	88409	2,89918447
0,045	18	150csistema	8,822	270272	18	150csistema	8,8	94153	2,87056175
0,045	19	150dsistema	8,821	264343	19	150dsistema	8,801	88505	2,98675781
0,045	20	175asistema	8,822	303292	20	175asistema	8,802	86086	3,52312803
0,0525	21	175bsistema	8,82	334404	21	175bsistema	8,799	96470	3,46640406
0,0525	22	175csistema	8,821	298081	22	175csistema	8,801	87478	3,40749674
0,0525	23	175dsistema	8,82	343426	23	175dsistema	8,8	95359	3,60140102
0,0525	24	175esistema	8,822	324458	24	175esistema	8,802	94261	3,44212347

Anexo 7 Secuencia para la confirmación de las muestras preliminares positivas

```

*****
Varian Star Workstation - 8400 SampleList Tue Nov 03 20:01:19 2015
SampleList: C:\JULIAN PULIDO\VALIDACION OCTUBRE 2015\muestras tesis\muestras tesis.smp
Created: Tue Nov 03 19:30:26 2015
Modified: Tue Nov 03 19:59:27 2015
*****

```

Line	Sample Type	Sample Name	Inj.	Vial	Inject Volume	Amount Standard
1	Analysis	hexano1	1	0	1200.0	1
2	Analysis	hexano2	1	1	1200.0	1
3	Analysis	hexano2	1	2	1200.0	1
4	Analysis	blanco react	1	3	1200.0	1
5	Analysis	blanco orina	1	4	1200.0	1
6	Analysis	LOD thca-be	1	5	1200.0	1
7	Analysis	hexano3	1	0	1200.0	1
8	Analysis	15a thca-be	1	6	1200.0	1
9	Analysis	hexano4	1	0	1200.0	1
10	Analysis	15b thca-be	1	7	1200.0	1
11	Analysis	hexano5	1	0	1200.0	1
12	Analysis	81athca-be	1	8	1200.0	1
13	Analysis	hexano6	1	0	1200.0	1
14	Analysis	81bthca-be	1	9	1200.0	1
15	Analysis	hexano7	1	0	1200.0	1
16	Analysis	137athca-be	1	10	1200.0	1
17	Analysis	hexano8	1	0	1200.0	1
18	Analysis	137bthca-be	1	11	1200.0	1
19	Analysis	hexano9	1	0	1200.0	1
20	Analysis	76athca-be	1	12	1200.0	1
21	Analysis	hexano10	1	0	1200.0	1
22	Analysis	76bthca-be	1	13	1200.0	1
23	Analysis	hexano11	1	0	1200.0	1
24	Analysis	306athca-be	1	14	1200.0	1
25	Analysis	hexano12	1	1	1200.0	1
26	Analysis	306bthca-be	1	15	1200.0	1
27	Analysis	hexano13	1	1	1200.0	1
28	Analysis	305athca-be	1	16	1200.0	1
29	Analysis	hexano14	1	1	1200.0	1
30	Analysis	305bthca-be	1	17	1200.0	1
31	Analysis	hexano15	1	1	1200.0	1
32	Analysis	122athca-be	1	18	1200.0	1
33	Analysis	hexano16	1	1	1200.0	1
34	Analysis	122bthca-be	1	19	1200.0	1
35	Analysis	hexano17	1	1	1200.0	1
36	Analysis	127athca-be	1	20	1200.0	1
37	Analysis	hexano18	1	1	1200.0	1
38	Analysis	127b	1	21	1200.0	1
39	Analysis	hexano19	1	1	1200.0	1
40	Analysis	146thca-be	1	22	1200.0	1
41	Analysis	hexano20	1	1	1200.0	1
42	Analysis	171a thca	1	23	1200.0	1
43	Analysis	hexano21	1	1	1200.0	1
44	Analysis	171b thca	1	24	1200.0	1
45	Analysis	hexano22	1	2	1200.0	1
46	Analysis	15a thca	1	25	1200.0	1
47	Analysis	hexano23	1	2	1200.0	1
48	Analysis	15 b thca	1	26	1200.0	1
49	Analysis	hexano24	1	2	1200.0	1
50	Analysis	203 a thca	1	27	1200.0	1
51	Analysis	hexano25	1	2	1200.0	1
52	Analysis	203b thca	1	28	1200.0	1
53	Analysis	hexano26	1	2	1200.0	1
54	Analysis	64a thca	1	29	1200.0	1
55	Analysis	hexano27	1	2	1200.0	1
56	Analysis	64b thca	1	30	1200.0	1
57	Analysis	hexano28	1	2	1200.0	1
58	Analysis	106 a thca	1	31	1200.0	1
59	Analysis	hexano29	1	2	1200.0	1
60	Analysis	106b thca	1	32	1200.0	1
61	Analysis	hexano30	1	2	1200.0	1
62	Analysis	154 a thca	1	33	1200.0	1
63	Analysis	hexano31	1	2	1200.0	1
64	Analysis	154b thca	1	34	1200.0	1
65	Analysis	hexano32	1	1	1200.0	1
66	Analysis	128a thca	1	35	1200.0	1
67	Analysis	hexano33	1	1	1200.0	1
68	Analysis	128b thca	1	36	1200.0	1
69	Analysis	hexano34	1	1	1200.0	1
70	Analysis	170a thca	1	37	1200.0	1
71	Analysis	hexano35	1	1	1200.0	1
72	Analysis	170b thca	1	38	1200.0	1
73	Analysis	hexano36	1	1	1200.0	1
74	Analysis	269a thca	1	39	1200.0	1
75	Analysis	hexano37	1	1	1200.0	1
76	Analysis	269 b thca	1	40	1200.0	1
77	Analysis	hexano38	1	1	1200.0	1
78	Analysis	87a thca	1	41	1200.0	1
79	Analysis	hexano39	1	1	1200.0	1
80	Analysis	87 b thca	1	42	1200.0	1
81	Analysis	hexano40	1	1	1200.0	1
82	Analysis	176a thca	1	43	1200.0	1
83	Analysis	hexano41	1	1	1200.0	1
84	Analysis	176b thca	1	44	1200.0	1
85	Analysis	hexano42	1	0	1200.0	1
86	Analysis	LOD BE	1	45	1200.0	1
87	Analysis	hexano43	1	0	1200.0	1
88	Analysis	44 a be	1	46	1200.0	1
89	Analysis	hexano44	1	0	1200.0	1
90	Analysis	44b be	1	47	1200.0	1
91	Analysis	hexano45	1	0	1200.0	1
92	Analysis	75 a be	1	48	1200.0	1
93	Analysis	hexano46	1	0	1200.0	1
94	Analysis	75 b be	1	49	1200.0	1
95	Analysis	hexano47	1	0	1200.0	1
96	Analysis	43a be	1	50	1200.0	1
97	Analysis	hexano48	1	0	1200.0	1
98	Analysis	43b be	1	51	1200.0	1
99	Analysis	hexano49	1	0	1200.0	1
100	Analysis	36a be	1	52	1200.0	1
101	Analysis	hexano50	1	0	1200.0	1
102	Analysis	36b be	1	53	1200.0	1
103	Analysis	hexano51	1	0	1200.0	1
104	Analysis	94 a be	1	54	1200.0	1
105	Analysis	hexano52	1	1	1200.0	1
106	Analysis	94b be	1	55	1200.0	1

107	Analysis	hexano53	1	1	1200.0	1
108	Analysis	204 a be	1	56	1200.0	1
109	Analysis	hexano54	1	1	1200.0	1
110	Analysis	204 b be	1	57	1200.0	1
111	Analysis	hexano55	1	1	1200.0	1
112	Analysis	16a be	1	58	1200.0	1
113	Analysis	hexano56	1	1	1200.0	1
114	Analysis	16b be	1	59	1200.0	1
115	Analysis	hexano57	1	1	1200.0	1
116	Analysis	57 a be	1	60	1200.0	1
117	Analysis	hexano58	1	1	1200.0	1
118	Analysis	57 b be	1	61	1200.0	1
119	Analysis	hexano59	1	1	1200.0	1
120	Analysis	62 a be	1	62	1200.0	1
121	Analysis	hexano60	1	1	1200.0	1
122	Analysis	62b be	1	63	1200.0	1
123	Analysis	hexano61	1	1	1200.0	1
124	Analysis	54a be	1	64	1200.0	1
125	Analysis	hexano62	1	2	1200.0	1
126	Analysis	54b be	1	65	1200.0	1
127	Analysis	hexano63	1	2	1200.0	1
128	Analysis	152 a be	1	66	1200.0	1
129	Analysis	hexano64	1	2	1200.0	1
130	Analysis	152b be	1	67	1200.0	1
131	Analysis	hexano65	1	2	1200.0	1
132	Analysis	220 a be	1	68	1200.0	1
133	Analysis	hexano66	1	2	1200.0	1
134	Analysis	220 b be	1	69	1200.0	1
135	Analysis	hexano67	1	2	1200.0	1
136	Analysis	62 a be	1	70	1200.0	1
137	Analysis	hexano68	1	2	1200.0	1
138	Analysis	62 b be	1	71	1200.0	1
139	Analysis	hexano69	1	2	1200.0	1
140	Analysis	286a be	1	72	1200.0	1
141	Analysis	hexano70	1	2	1200.0	1
142	Analysis	286 b be	1	73	1200.0	1
143	Analysis	hexano71	1	2	1200.0	1
144	Analysis	LOD thca be	1	74	1200.0	1
145	Analysis	hexano72	1	0	1200.0	1
146	Analysis	inter lab 1	1	75	1200.0	1
147	Analysis	hexano73	1	0	1200.0	1
148	Analysis	inter lab 2	1	76	1200.0	1
149	Analysis	hexano74	1	0	1200.0	1
150	Analysis	inter lab 3	1	77	1200.0	1
151	Analysis	hexano75	1	0	1200.0	1
152	Analysis	inter lab 4	1	78	1200.0	1
153	Analysis	hexano76	1	0	1200.0	1

Directory for Data Files: c:\julian pulido\validacion octubre 2015\muestras tesis

Data File Names: %s %d %t%h

Create and update a new RecalcList: c:\julian pulido\validacion octubre 2015\muestras tesis\muestras tesis.rcl.

Anexo 8 Acta de comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

ACTA DE EVALUACIÓN: N°. 020-213-15
Fecha: 26 de noviembre 2015

Nombre completo del proyecto: "DETERMINACIÓN SIMULTANEA DE 11-NOR-9CARBOXY-DELTA-9-TETRAHIDROCANNABINOL Y BENZOILECGONINA EN ORINA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS COMO BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN CANNABIS Y COCAÍNA".

Versión número: 01

Sometido por: el estudiante Julián Herney Pulido Vargas

Presentado por: el profesor Miguel Cote Méndez, Coordinador Académico

Departamento o Sección: Maestría en Toxicología la Facultad de Medicina

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 26 de noviembre de 2015

EL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996 actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
- ✓ Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo)
- ✓ Copia del proyecto completo de investigación,
- ✓ Dos resúmenes ejecutivos
- ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).
- ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto
- ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
- ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)








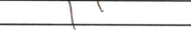


2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

- | | | |
|---|--------------------------------|--|
| 1 | Amador Luis Roberto | Departamento de Patología |
| 2 | Arteaga Díaz Clara Eugenia | Departamento de Morfología |
| 3 | Duarte Gutiérrez Liz Marcela | Asesora Jurídica Facultad de Medicina |
| 4 | Guerrero Fonseca Carlos Arturo | Presidente Comité de Ética / Departamento de Ciencias Fisiológicas |
| 5 | Parra Pineda Mario Orlando | Departamento de Obstetricia y Ginecología |

Elb/, Jeannette P. Al.-

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 401
Teléfono: (57-1) 316 5251 Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 15167 – 15008
Correo electrónico: eticasalud_fm bog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

Anexo 9 Acta de comité de ética del hospital la Victoria

HOSPITAL LA VICTORIA III NIVEL E.S.E			
ACTA DE COMITÉ No: 002/14			
REGLAMENTACIÓN COMITÉ: Resolución No. 0198 del 29 de Agosto de 2.007			
Nombre del comité:	COMITÉ DE BIOETICA	Fecha :	JUNIO 4/14
Lugar:	SALA DE JUNTAS	Hora inicio:	10:00 a.m
Unidad Estratégica y/o Funcional:	OFICINA ASESORA JURIDICA	Hora final:	12:00 a.m
1. OBJETIVO			
Presentación y aprobación de proyectos de investigación.			
2. ORDEN DEL DIA			
1	VERIFICACION DEL QUORUM		
2	PRESENTACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN		
3	APROBACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN		
4	VARIOS		
5			
6			
1. VERIFICACIÓN DE QUÓRUM			
CARGO	NOMBRE	FIRMA	
GERENTE	FERNANDO ANIBAL PEÑA DIAZ		
SUBGERENTE SERV DE SALUD	YANITH PIRAGAUTA GUTIERREZ		
COORDINADORA SALUD MENTAL	PILAR MANCERA		
COORDINADOR DE PEDIATRIA	MAURICIO GARZON GRANADOS		
TRABAJADORA SOCIAL	ANA ZORLEY GUTIERREZ		
COORDINADORA DE ENFERMERIA	PATRICIA SABOGAL		
MEDICINA INTERNA	JOSE LUIS MARTINEZ		
COORDINADORA EDUCACION MED	SANDRA PAOLA DAZA		
SECRETARIA TECNICA	MANUEL DE JESUS OLARTE		
INVITADO	EDUARDO CARO		
2. DESARROLLO DEL COMITÉ			
<p>1.1. Se hace la presentación de los resultados de la investigación realizada por parte del Dr. Carlos Lara y la Dra. Sandra Paola Daza en la cual se realiza entrega de los resultados de los estudios retrospectivos descriptivos de los cuales se tomó información estadística, no se requirió datos personales de los usuarios, de la localidad IV, dentro de los cuales participaron el Hospital San Cristóbal I Nivel, Hospital San Blas II Nivel y Hospital la Victoria III Nivel, El nombre del primer artículo es: -"Análisis retrospectivo de la carga económica y enfermedad de las neumonías en</p>			

niños menores de cinco años en la localidad de San Cristóbal", Autores: Carlos Lara, Sandra Paola Daza, Néstor Fabián Franco y Diana De Graeve.

El segundo artículo es: -"Cost effectiveness analysis of pneumococcal and influenza vaccines administered to children less than five years of age in a low-income district of Bogotá, Colombia". Autores: Carlos Lara, Sandra Paola Daza, Néstor Fabián Franco y Diana de Graeve.

Se concluye que es costo efectivo la vacunación con respecto a la disminución de prevalencia e incidencia de neumonía, sin embargo, puede hacerse más efectiva si se tuviese en cuenta la época epidemiológica vs tiempos o jornadas de vacunación las cuales no son coincidentes y generan fracasos en la completitud de los esquemas instaurados en el Distrito Capital.

1.2 Se hace la presentación del proyecto por parte de la Dra. Diana Marcela Pava de la Universidad Nacional de Colombia, el cual consistirá en **Alteraciones Neurológicas en Hijos de Madres consumidoras de Sustancias Psicoactivas Atendidas en el Hospital La Victoria Sedes I y II de la Ciudad de Bogotá – Colombia 2014.** Este proyecto pretende Identificar y describir las alteraciones neurológicas presentes en recién nacidos vivos y su relación con el consumo materno de sustancias psicoactivas, establecer la prevalencia de alteraciones neurológicas en recién nacidos vivos de dos hospitales de Bogotá, Describir las características neurológicas clínicas de las alteraciones encontradas, Establecer la prevalencia del consumo de sustancias psicoactivas en el embarazo, Establecer diferencias estadísticas entre las alteraciones neurológicas encontradas debidas al consumo materno de sustancias psicoactivas.

Se realizará un estudio transversal (cross-sectional), el cual será estadístico y demográfico, observacional descriptivo, que mide a la vez la prevalencia de la exposición y el efecto en una muestra poblacional, en un solo momento temporal, permite estimar la magnitud y distribución de la enfermedad o fenómeno en un momento dado.

En este estudio se pretende establecer la relación existente entre un factor de riesgo que en este caso es el consumo de sustancias psicoactivas en gestantes y un efecto que en este estudio son las alteraciones neurológicas en neonatos.

La población de estudio estará conformada por neonatos de ambos sexos, atendidos en el Hospital de la Victoria sedes I y II. pertenecientes a la red distrital de salud de la ciudad de Bogotá Colombia.

Los instrumentos a utilizar serán: Consentimiento Informado, Historial de Consumo de sustancias psicoactivas por parte de la madre, test de adaptación neonatal de Apgar al minuto y a los 5 minutos y el grado de madurez neurológica mediante la presencia o ausencia de reflejos primitivos determinar la prevaencia de la infección en mujeres gestantes de 15 a 35 años con embarazo ectópico, aborto séptico, parto pretérmino idiopático y ruptura prematura de membranas espontánea, identificar factores de riesgo asociados con la infección Chlamydia trachomatis en mujeres gestantes de 15 a 35 años con las patologías estudiadas, implementar y transferir metodologías diagnósticas útiles para el tamizaje de la infección a los laboratorios con la infraestructura adecuada, establecer los patrones de susceptibilidad antimicrobiana en los aislamientos de Neisseria gonorrhoeae recuperados a partir de las muestras clínicas estudiadas.

La trabajadora social manifiesta a la expositora que es necesario enfatizar más en las preguntas 4 y 5 del Anexo 1 (Encuesta) describiendo a los usuarios las posibles enfermedades neurológicas ya que ellos pueden no tener conocimiento al respecto al contestar la encuesta, a lo que la estudiante manifiesta que ella se las enunciara a los pacientes al momento de encuestarlos.

1.3 Se hace la presentación del proyecto por parte del estudiante Julián Herney Pulido Vargas de

la Universidad Nacional de Colombia, el cual consistirá en **Determinación simultanea de THA, MDMA, Benzoilegonina y 6 Am en orina por cromatografía de gases con espectrometría de masas como biomarcadores de exposición a cannabis, Cocaína, MDMA y Heroína.** Este proyecto pretende desarrollar y estandarizar una metodología analítica para el análisis simultaneo de THCA, MDMA, BE y GAM en orina por GC-MS; Validar una metodología analítica para la determinación simultanea de THCA, MDMA, Benzoilegonina y 6AM en orina como indicadores de consumo agudo de cannabis, cocaína, MDMA y heroína; Poner a prueba la metodología analítica mediante la determinación de THCA, MDMA, Benzolegonina y 6AM en orina en voluntarios consumidores.

Este proyecto se realizara de la mano con el proyecto de la Dra. Diana Marcela Pava, por tal razón los dos expositores informan que los insumos utilizados a lo largo de la investigación serán suministrados por ellos, al igual que el almacenamiento y el transporte, lo único en que solicitan ayuda de los especialistas es en la recolección de las muestras.

1.4. Se hace la presentación del proyecto por parte de las estudiantes de la Universidad Antonio Nariño Martha Nancy Calderón y Ana Luisa Muñoz, el cual se titula "**Caracterización de los niveles de Albumina modificada por Isquemia (IMA) en gestantes y cordón umbilical en pacientes de Bogotá y Cundinamarca**", en el cual se analizara este biomarcador de estrés oxidativo durante el embarazo y la etapa perinatal, por su temprano valor predictivo de diferentes procesos patológicos. El lograr detectar tempranamente alteraciones en la homeostasis materna y fetal que llevan a procesos de abortos espontaneos o en el parto a asfixia perinatal, entre otras patologías, permitirá reducir la morbi-mortalidad de esta población.

Este estudio está enfocado a maternas entre 15 a 49 años que hayan aceptado participar en el mismo, mediante la firma del consentimiento informado, enroladas por las instituciones de salud participantes en el periodo comprendido entre Enero de 2015 u junio de 2016, se incluyen también, mujeres dentro de ese rango de edad no gestantes.

La población objeto del estudio se dividirá en tres grupos: **Grupo 1:** 50 mujeres no gestantes sin evidencia clínica de enfermedad. **Grupo 2:** 150 mujeres gestantes saludables sin evidencia clínica de enfermedad. **Grupo 3:** Mujeres gestantes con antecedentes de enfermedad y embarazo de alto riesgo.

Para la ejecución de proceso que recolectara una muestra de plasma sanguíneo proveniente de sangre venosa extraída de la fosa anticubital, en tubo de 5 ml con heparina como anticoagulante. Se recolectará 3 ml de sangre venosa extraída en tubo seco. Las muestras se tomarán en las visitas rutinarias de control prenatal, bajo las condiciones de buenas prácticas clínicas y de laboratorio, establecidas por cada entidad participante.

Dentro de la investigación se realizarán cuatro momentos de muestreo de sangre para cada paciente: Primera muestra: Entre las semanas 10 y 15 de gestación.

Segunda muestra: entre las semanas 22 y 25 de gestación.

Tercera muestra. Entre las semanas 34 y 38 gestación.

Cuarta muestra: Cordón umbilical.

El Dr. Caro pregunta al grupo expositor ¿Cómo se tomará, guardará y rotulará la muestra del cordón umbilical? A lo que las estudiantes manifiestan que la obtención de la muestra se realizara durante los primeros 15 minutos después del nacimiento. Se realizara un asa con el cordón umbilical, pinzándolo de tres a cinco centímetros por arriba de la ligadura. Luego se contará el cordón con yodo o cualquier producto que lo contenga; se recomienda tener a la mano una gasa para fijar el cordón en el momento de obtener la muestra y con la jeringa 4 ml de sangre en tubo verde (con heparina) y 1 ml en tubo rojo. Durante el procedimiento de toma de muestra deben

seguirse las precauciones universales para manipulación de material de riesgo biológico.

Las estudiantes informar al Comité que todos los insumos y materiales necesarios para la toma de las muestras serán suministrados por ellas, pero solicitan que las muestras sean tomadas por el personal de la entidad y almacenadas en el laboratorio clínico, mientras que ellas realizan el traslado para el análisis. El Dr. Caro manifestó no tener problema siempre y cuando se realizara previamente una reunión con los especialistas, internos y residentes para que se les explique la metodología y logística de la investigación en una reunión con el Referente de Ginecología Dr. Reinaldo Niño.

Aprobación de proyectos de investigación

- **Alteraciones Neurológicas en Hijos de Madres consumidoras de Sustancias Psicoactivas Atendidas en el Hospital La Victoria Sedes I y II de la Ciudad de Bogotá – Colombia 2014**, por parte de la Dra. Diana Marcela Pava de la Universidad Nacional de Colombia: Se aprueba el proyecto.
- **Determinación simultanea de THA, MDMA, Bensoilegonina y 6 Am en orina por cromatografía de gases con espectrometría de masas como biomarcadores de exposición a cannabis, Cocaína, MDMA y Heroína**, por parte de Julian Herney Pulido de la Universidad Nacional de Colombia: Se aprueba el proyecto.
- **“Caracterización de los niveles de Albumina modificada por Isquemia (IMA) en gestantes y cordón umbilical en pacientes de Bogotá y Cundinamarca”**, por parte de las estudiantes de la Universidad Antonio Nariño Martha Nancy Calderón y Ana Luisa Muñoz: No se aprueba el proyecto.

Siendo las 12:00 a.m y habiendo agotado el orden del día para la presente sesión del Comité, se da por terminado el mismo.

La presente acta se discutió y aprobó en sesión ordinaria del Comité de Bioética, sus miembros la suscriben en constancia de aprobación a los 4 días del mes de junio de 2014.

Anexo 10 Inserto del inmunoensayo empleado



MULTIDROGA PANEL X 10

AMP/BAR/BZD/COC/THC/mAMP/MTD/OP/OTCA/PCP

TIPO DE ENSAYO	CUALITATIVO
MUESTRA	ORINA
SENSIBILIDAD	99%
EXACTITUD	>99%
MÉTODO	INMUNOCROMATOGRAFICO
PRESENTACIÓN	COPIA

INTRODUCCION

El panel XERION MULTIDROGA X 10 DROGAS AMP/BAR/BZD/COC/THC/AMP/MTD/OP/OTCA/PCP (Orina) permite la determinación visual cualitativa simultánea de drogas de abuso en un solo paso en muestras de orina humana. La rapidez y sensibilidad de este inmunoensayo han hecho que sean usados como método de screen. Los resultados de la prueba son rápidos, fáciles de leer y no requiere de instrumentación o reactivos adicionales. El panel XERION a 10 presentación copa es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa de 10 metabolitos en orina en las siguientes concentraciones del cut-off de cada sustancia:

DROGA	METABOLITO	CUT OFF
Amfetamina (AMP)	d-Amfetamina	1,000 ng/ml
Barbitúricos (BAR)	Secobarbital	400 ng/ml
Benzodiazepinas (BZD)	Clonazepam	400 ng/ml
Cocaína (COC)	Benzoilcocaína	400 ng/ml
Mariguana (THC)	11-nor- Δ^9 -THC-COOH	50 ng/ml
Metamfetamina (mAMP)	D-Metamfetamina	1,000 ng/ml
Metadona (MTD)	Metadona	400 ng/ml
Opiáceo (OP) MORF	Morfina	2,000 ng/ml
Antidepresivos Tricíclicos (TCA)	Metabolitos	1,000 ng/ml
Phencyclidina (PCP)	Phencyclidina	25 ng/ml

Este test detecta otras sustancias relacionadas, por favor referirse a las especificaciones analíticas de esta tabla.

RESUMEN

ANFETAMINAS

Estimulantes del SNC utilizados médicamente en el tratamiento de la narcolepsia, atención del sueño caracterizada por episodios diurnos de sueño incontrolables y en el tratamiento de la hiperactividad infantil. Estas son fácilmente absorbidas por el tracto gastrointestinal y pueden ser detectadas en la orina 1 o 2 días después de su uso. Grandes dosis de Anfetaminas pueden llevar al desarrollo de tolerancia y dependencia psicológica, lo cual conduce al abuso. Las Anfetaminas mejoran el estado de ánimo, disminuyen el apetito, la necesidad de dormir y el cansancio, volviendo al consumidor a menudo más irritable y hablador, consumiéndose durante períodos prolongados, pueden producir una psicosis similar a la esquizofrenia aguda. Los efectos generalmente aparecen de 2 a 4 horas después de su uso y la droga tiene una vida media de 4 a 24 horas en el cuerpo.

BARBITÚRICOS

Son fármacos depresores del Sistema Nervioso Central, se prescriben como sedantes, hipnóticos y anticonvulsivos, para tratar el insomnio nervioso severo, algunas formas de epilepsia y determinados trastornos psicológicos. Durante mucho tiempo, barbitúricos y opiáceos fueron las únicas sustancias disponibles para calmar la ansiedad o la agitación de algunos pacientes psiquiátricos. Esto hizo que su utilización clínica se generalizara y su abuso no tardó en convertirse en un problema social y de salud en muchos países. Se ingieren por vía oral en forma de capsulas o tabletas, y producen una gran variedad de efectos que incluyen la sedación y la amnesia anterógrada (olvido de situaciones a partir de su consumo). Los efectos por su consumo se parecen a los estados de embriaguez. El uso continuado de barbitúricos lleva a la tolerancia y la dependencia física. La ingestión de 400 mg/día de barbitúricos durante 3-3 meses produce un grado significativo de dependencia. Solamente una pequeña cantidad (menos del 5%) de los barbitúricos es excretado sin alteración por la orina. El período de detección de barbitúricos en muestras de orina varía de 4 a 7 días después de su consumo.

BENZODIAZEPINAS

Son fármacos hipnóticos sedantes, que se utilizan en el tratamiento de la ansiedad, trastornos del sueño (insomnio), epilepsia y el abandono del alcohol. Entre sus receptores específicos tiene un neurotransmisor químico conocido como ácido gamma amino butírico (GABA). Determinadas Benzodiazepinas se prescriben como relajantes para aliviar las contracturas musculares dolorosas asociadas con ciertos trastornos neurológicos. Dado que las Benzodiazepinas son más seguras y eficaces. El riesgo de dependencia física aumenta cuando las Benzodiazepinas se toman con regularidad (diariamente) durante varios meses, especialmente a dosis más elevadas de las normales. Su interrupción abrupta

puede originar síndrome de abstinencia que se manifiesta con trastornos del sueño (insomnio) y gastrointestinal, ataxia, pérdida de apetito, fatiga, temblores, debilidad, ansiedad, reflejos disminuidos, disminución de la temperatura corporal, cambios de la percepción y en la sobriedad intensa depresión respiratoria. Solo cantidades muy pequeñas (menos del 1%) de la mayoría de las benzodiazepinas se eliminan intactas en la orina, apareciendo la mayor concentración en orina en forma de una droga conjugada. El período de detección de las Benzodiazepinas en la orina es de 3-7 días.

COCAINA

Es una sustancia legal y su uso no tiene ninguna finalidad médica. Es un alcaloide contenido en las hojas del arbusto *Erythroxylon coca* siendo químicamente un derivado de la atropina. Es un estimulante cerebral extremadamente potente, de efectos similares a las anfetaminas. Inicialmente se utilizó como anestésico local y como parte de un tónico estimulante (Vino Mariani), pero al evidenciarse su efecto adictivo se consideró como droga legal desde principios del siglo XX. Se aisló químicamente como Clorhidrato de Cocaína de alto poder adictivo. Dentro de los efectos psicológicos inducidos por el uso de la cocaína se encuentran: sensación de euforia y de extrema seguridad en sí mismo, además de un estado de alerta intenso, seguido de depresión. Provoca actitudes agresivas y temerarias, así como estados de paranoia y cambios en el estado de ánimo, los cambios conductuales son cambiantes: euforia, agresión, grandiosidad, estado de alerta, agitación psicomótrica, sentimientos paranoicos y deterioro en el proceso de pensamiento. Se metaboliza en el hígado y se elimina por la orina principalmente como benzoylconina, la cual tiene una vida media de 5-8 horas siendo mucho mayor que la vida media de la cocaína (0.5-1.5 horas).

MARIHUANA

Es un alucinógeno que se obtiene triturando las hojas, las ramas y las flores de la planta *Cannabis sativa*. Los ingredientes activos de la marihuana Tetrahidrocanabinol (THC) y Canabinoles pueden ser metabolizados y excretados en la orina como 11-nor- Δ^9 -THC-COOH con una vida media de 24 horas. La forma más habitual de consumo es fumada aunque también se pueden mastigar las hojas. Produce efectos de relajación, pérdida de coordinación, ansiedad, paranoia, depresión, confusión, aceleración del ritmo cardíaco, alteración de la percepción del tiempo (que transcurre más despacio), agudización de los sentidos (oído, tacto, gusto y olfato) euforia. Los efectos varían de acuerdo a la dosis consumida y de las circunstancias que rodean su consumo, duran aproximadamente 20-30 minutos y se presentan 90-120 minutos después del consumo. Altas dosis de canabinoides pueden llevar al desarrollo de tolerancia y dependencia fisiológica lo cual conduce al abuso, se pueden detectar sus metabolitos en orina se encuentran durante las horas de exposición y permanecen detectables de 3-10 días después.

METANFETAMINA

La Metanfetamina y algunos de sus derivados son estimulantes del SNC con aplicaciones terapéuticas, el uso de dosis elevadas produce euforia, mejora en el estado de ánimo, una sensación de incremento instantáneo de la energía y la fuerza. Grandes dosis de Metanfetaminas pueden causar el desarrollo de tolerancia y dependencia psicológica, lo cual conduce al abuso. Los efectos de la Metanfetamina duran generalmente de 3-4 horas y la droga tiene una vida media de 9-24 horas en el organismo. Es excretada en orina principalmente como Anfetamina, derivados oxidados y deaminados. Sin embargo, un 10-20% de la Metanfetamina es excretada como tal. En cualquier caso, la presencia de compuestos derivados de ella en la orina indica consumo de Metanfetamina, la cual es detectable en la orina generalmente en la orina durante 3-5 días, dependiendo del nivel del pH en la orina.

METADONA

Sustancia sintética derivada del opio. En su forma básica es un polvo blanco cristalino, pero suele estar disponible en varias formas y presentaciones: comprimidos, supositorios y autoinyectables; se usa en programas especiales para el tratamiento de la dependencia a la heroína. Neutraliza la euforia producida por el uso de heroína y evita la aparición del síndrome de Abstinencia. Se metaboliza en el hígado y su excreción ocurre a través del riñón en forma inalterable o de sus derivados en concentraciones de 50 mg/dl o más. La Metadona produce efectos secundarios: aturdimiento, mareos, náuseas, vómitos y boca seca.

OPIACEOS

Los opiáceos se refieren a cualquier droga derivada del opio (*Papaver Somniferum* o *Amopala*), incluyendo productos naturales, morfina y codeína, y drogas semisintéticas como la heroína. La heroína y la codeína son rápidamente metabolizadas a morfina en el cuerpo, por eso la presencia de morfina o su metabolito glucuronido de morfina son indicadores del uso de heroína, morfina y/o codeína. Los opiáceos son las drogas con mayor poder adictivo, debido a que entran en el cerebro rápidamente.

ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS (TCA)

Los TCA (Antidepresivos Tricíclicos) son utilizados comúnmente para el tratamiento de trastornos depresivos. Los metabolitos de TCA pueden dar como

Para información actualizada consulte nuestro sitio en Internet: www.xerion.com.co

Línea de atención al usuario: Bogotá: 533 3025 / Nacional (Gratuita): 01 8000 51 IMEX (4639) / E-mail: usuario@xerion.com.co

resultado depresión profunda del SNC, cardiotoxicidad y efectos anticolinérgicos, al igual es la causa de muerte más común por drogas de prescripción. Los TCA son metabolizados en el hígado y hasta por días [10] días se excretan en orina, la mayor parte en forma de metabolitos: Nortriptilina (1000 ng/ml), Nondeseplina (1000 ng/ml), Trinitramina (3000 ng/ml), Amitriptilina (1500 ng/ml), Prometazina (1500 ng/ml), Deslorammina (200 ng/ml), Imipramina (40 ng/ml), Clomipramina (12.500 ng/ml), Doxepina (2000 ng/ml), Maprotilina (2000 ng/ml), Prometazina (25.000ng/ml)

FENCICLIDINA

La Fenciclidina (PCP) también llamada polvo de ángel se comenzó a fabricar en los años 50 como anestésico intravenoso. Pero su uso en seres humanos se discontinuó por haberse descubierto que los pacientes se mostraban agitados, con alucinaciones delirantes e irracionales, mientras se recuperaban de sus efectos anestésicos. La PCP es un polvo blanco cristalino que se disuelve fácilmente en agua o alcohol. Tiene un sabor químico amargo distintivo. Se puede masticar con facilidad con colorantes y se vende en el mercado de drogas ilícitas en forma de diversas clases de tabletas, cápsulas y polvos de color. Por lo general, hay tres formas de uso: se inhala, se fuma o se ingiere. Para fumarla se suele aplicar a hojas de plantas, como marihuana, perejil, orégano o marihuana. El PCP se puede detectar en la orina en un plazo de 4 a 6 horas después de su uso y permanece en la orina de 7-14 días, dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la actividad y la dieta. La Fenciclidina se elimina en la orina sin metabolizar en un 4-19% y como metabolitos conjugados 25-30%.

PRINCIPIO

El dispositivo XERION MULTIDROGAS PANEL X 10 (orina) copa es un inmunoensayo cromatográfico basado en el principio de uniones por competencia. Las drogas que se pueden presentar en la orina compiten frente al conjugado de la misma en los puntos de unión al anticuerpo. Durante la prueba la muestra de orina migra a lo largo de cada una de las tiras por acción capilar. Si una droga está presente en la muestra en concentraciones por debajo del cut-off, no saturará los sitios de unión de los anticuerpos. Las partículas recubiertas de anticuerpos serán capturadas por el conjugado inmovilizado del metabolito y una línea visible de color aparecerá en la zona de la prueba, si por el contrario la muestra tiene una concentración mayor a la del cut-off esta línea de color no se forma porque saturará todos los puntos de unión de los anticuerpos. La prueba contiene anticuerpos monodireccionales de ratón anti-droga unidos a partículas y conjugados de proteína-droga. En el sistema de la línea de control se usa un anticuerpo de cabra.

MATERIALES SUMINISTRADOS

- > Un panel de diagnóstico XERION MULTIDROGAS X 10 (orina) en copa.

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- > Balanza o cronómetro

OBTENCION DE LA MUESTRA

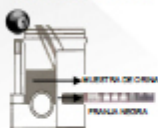
Toda muestra debe ser manipulada con la suficiente precaución como si fuera potencialmente infecciosa

- > Retire la tapa del dispositivo provisto, recoja una muestra de orina fresca dentro de él y luego tápelo ejerciendo presión sobre las esquinas.
- > Se aconseja realizar el ensayo lo más pronto posible, si esto no ocurre conserve la muestra en refrigeración (2°C - 8°C). No agregue agentes conservantes a la muestra.

PROCEDIMIENTO

Permita que la muestra alcance la temperatura ambiente antes del ensayo.

1. Después de recoger la muestra de orina espere 4 minutos para ajustar la temperatura de 30 a 37°C que se evidencia con un color verde en la franja negra atrás del recipiente.
2. Inserte la llave dentro del orificio derecho y presione con fuerza.
3. Remueva el papel que cubre el panel.
4. Lea a los 5 minutos.



INTERPRETACION DE RESULTADOS

- > Utilice buena iluminación durante la interpretación de resultados.
- > No interprete los resultados después de 10 minutos de iniciado el ensayo ya que después de este tiempo la interpretación puede ser equivocada.

Negativo: Aparecen dos bandas de color, una en la región de control (C) y una banda de color en la región de prueba (T). La intensidad del color de la banda en la región de prueba (T) puede variar. El resultado negativo indica que la concentración de la droga en la muestra está por debajo del cut-off para esa droga específica.

Positivo: Aparece únicamente una banda de color en la región de control (C). No hay una banda visible en la región de prueba (T). El resultado positivo indica que se ha detectado una concentración de la droga en la muestra igual o superior al cut-off para esa droga específica.

Prueba inválida: No se visualiza banda en absoluto o aparece solo una banda de color en la región de prueba (T). Repita el procedimiento utilizando un nuevo panel.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

El diagnóstico y la toxicología no pueden ser originados por el resultado de un único test. Son indispensables otras pruebas confirmatorias como la cromatografía de gases/espectrofotometría de masas.

Es posible que ocurran errores en el procedimiento o la técnica, o que actúen sustancias interferentes en la orina y causen resultados erróneos, también adulterantes como la lejía y alumbre. Si se sospecha de una adulteración, se debe repetir el test con otra muestra de orina.

Un resultado positivo no indica el nivel de intoxicación, la vía de administración o concentración en orina. Un resultado negativo no necesariamente indica que la orina está libre de drogas, se puede obtener si la concentración de la droga está por debajo del cut-off.

El test no distingue entre drogas de abuso y ciertos medicamentos.

CONTROL DE CALIDAD

La región de control (C) es el control interno del dispositivo que permite confirmar que el volumen de muestra utilizado en el ensayo ha sido el adecuado y el procedimiento ha sido realizado de manera correcta.

Las Buenas Prácticas de Laboratorio recomiendan verificar cada cierto tiempo que los componentes de los dispositivos de diagnóstico operan correctamente utilizando materiales de control diseñados para este fin. Utilícelos de manera similar a una muestra de Orina.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El panel XERION MULTIDROGAS X 10 copa debe permanecer hasta la fecha de vencimiento en sus respectivos envases de Aluminio sin abrir, refrigerados o a temperatura ambiente, alejados de la luz solar directa, la humedad y el calor excesivo.

La exposición del dispositivo de diagnóstico a temperaturas mayores a 30°C, puede reducir la vida media del producto u ocasionar el daño definitivo del mismo.

PRECAUCIONES

1. Se debe leer y seguir cuidadosamente las instrucciones del procedimiento de ensayo con el objeto de realizarlo en forma correcta.
2. Todos los materiales utilizados durante el ensayo se deben considerar como potencialmente infecciosos. Manipúelos y deséchelos de acuerdo con las normas vigentes.
3. Exclusivamente para diagnóstico IN VITRO y para ser usado por profesionales.
4. No utilice el dispositivo de diagnóstico después de la fecha de vencimiento indicada en el envase de aluminio.

Para información actualizada consulte nuestro sitio en Internet: www.xerion.com.co

Líneas de atención al usuario: Bogotá: 533 3025 / Nacional (Gratuita): 01 8000 51 IMEX (4639) / E-mail: usuario@xerion.com.co

5. Protajase utilizando guantes y bata.
6. No reutilice ninguno de los elementos del dispositivo de diagnóstico.
7. El panel de diagnóstico XERION MULTIDROGAS X 30 copa está diseñado para detectar el nivel de ciertas drogas de abuso o sus metabolitos en Orina Humana. El análisis en otras secreciones corporales no ha sido validado y puede no arrojar resultados correctos.
8. Adulterantes como blanqueadores u otros agentes oxidantes fuertes pueden dar lugar a resultados erróneos.

CRITERIOS DE DESEMPEÑO

Exactitud

Se comparó la prueba XERION MULTIDROGAS PANEL X 30 con una marca comercial líder de prueba rápida para drogas en orina. Se analizaron muestras previamente identificadas como positivas y se confirmaron por GC/MS; encontrándose una exactitud del 99.0%.

Sensibilidad y Especificidad

A 30 muestras de orina libre de drogas se le agregó drogas en concentraciones de cut-off +/- 50% y cut-off +/- 25% los resultados demostraron:

Cut off	AMP		BAR		BZO		COC		DRI	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
0%	30	0	30	0	30	0	30	0	30	0
-25%	30	0	30	0	30	0	30	0	30	0
-50%	24	6	23	7	25	5	24	6	25	5
Cut off	16	14	14	16	11	19	15	15	20	10
+25%	4	26	7	23	5	25	6	24	5	25
+50%	0	30	0	30	0	30	0	30	0	30

Cut off	THC		MTD		MET		TCA		POP	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
0%	30	0	30	0	30	0	30	0	30	0
-25%	30	0	30	0	30	0	30	0	30	0
-50%	24	6	26	4	23	7	25	5	30	0
Cut off	15	15	14	17	14	16	14	17	18	12
+25%	6	24	5	25	7	23	6	24	6	24
+50%	0	30	0	30	0	30	0	30	0	30

INTERFERENCIAS

Adulterantes como blanqueadores u otros agentes oxidantes fuertes pueden dar lugar a resultados erróneos.

Estudios demostraron que el pH y la densidad de la orina no tienen interferencia en la prueba. Ninguna otra interferencia conocida.

BIBLIOGRAFIA

1. Hawks RL, CN Chiang. *Urine Testing for Drugs of Abuse*. National Institute for Drug Abuse (NIDA), Research Monograph 73, 1986.
2. Baselt RC. *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. 2nd Ed. Biomedical Publ., Davis, CA 1982; 488.
3. Hawks RL, CN Chiang. *Urine testing for Drugs of Abuse*. National Institute for Drug Abuse (NIDA), Research Monograph 73, 1986.
4. IDA, Research Monograph 73, 1986.