



CIENCIA FORENSE LATINOAMERICANA

Volumen 2. Año 2016.

***“Nunca pienses que tu esfuerzo por mejorar el mundo es nada.
El bosque debe su belleza a la fugaz e ignorada presencia de
cada una de sus hojas”.***

Antonio Lagares (Psicólogo y Escritor argentino)



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



En este nuevo volumen de la revista Ciencia Forense Latinoamericana, órgano de difusión científica de la Asociación Latinoamericana de Ciencias Forenses (ALACIF), ofrecemos una serie de contribuciones por parte de colegas de nuestra Región con el objeto de compartir nuestras experiencias en este vasto campo de las Ciencias Forenses.

Gracias a la contribución de todos los participantes del 12º Congreso Latinoamericano de TIAFT pudimos reunir y compaginar los resúmenes y trabajos científicos, previo su revisión por parte de integrantes del Comité Científico editorial.

Ya estamos a las puertas del 12º Congreso Regional de TIAFT que se desarrollará en San José, Costa Rica desde el 9 al 12 de Noviembre de 2016. Queremos felicitar a los colegas del Comité Organizador del evento, a las autoridades universitarias y judiciales de la República de Costa Rica; especialmente al Profesor Freddy Arias Mora, Presidente del Congreso por su empeño en llevar a cabo este importante evento regional y lograr el objetivo de un nuevo número digital y hacer de ésta publicación un medio de comunicación de nuestras experiencias en el quehacer diario de las disciplinas científicas que auxilian a la Administración de Justicia. Esperamos en el futuro nos envíen sus comentarios, casos analizados, revisiones o trabajos originales, según el reglamento de publicación inserto al final del volumen.

De este modo podremos alcanzar, con el devenir de los años, que la revista sea emitida en forma regular, cuatrimestralmente. Este desafío depende de TODOS los científicos forenses latinoamericanos y esperamos que vean en esta publicación un medio idóneo de intercambio de saberes.

Agradecemos a todos los que de una u otra manera han ayudado a proseguir con el cometido que nos propusimos en nuestro primer encuentro en La Plata en el año 2005.

Doctores Leda Giannuzzi y Luis Ferrari
Comité Editorial
Ciencia Forense Latinoamericana

INDICE

-Abordaje de casos relacionados con nuevas sustancias psicoativas (Nps)	4
-FENITOÍNA EN SALIVA: CUANTIFICACIÓN POR FPIA Y SU APLICACIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA. (Phenytoin saliva: Quantification by FPIA and their application in clinical practice)	12
-HAIR TESTING FOR ANABOLIC DRUGS: A COMPENDIUM OF RESULTS .Pascal Kintz 1,2,	18
-CANNABIS MEDICINAL: POTENCIAL APLICACIÓN COMO MEDICAMENTO Y RIESGOS QUE ENTRAÑAN SU USO. / Revisión actualizada	22
-PHARMACOKINETICS AND POSTMORTEM TOXICOLOGY: ISSUES AND CAVEATS FOR INTERPRETATION	33
-ABORDAJE DE CASOS RELACIONADOS CON NUEVAS SUSTANCIAS PSICOATIVAS (NSP)	35
-STATE-OF-THE ART IN DETECTING DRIVING UNDER THE INFLUENCE OF ALCOHOL AND DRUGS	35
-AVANCES EN LA IMPLEMENTACIÓN DE LA LEY DE REGULARIZACIÓN DEL CANNABIS 19.172/2013 EN URUGUAY	36
-"SITUACIÓN DE LA MARIHUANA EN EL PARAGUAY: PROYECTO DE DESPENALIZACIÓN, USO MEDICINAL Y RECREACIONAL".	36
-ISRAEL SE PREPARA PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE CAMBIOS EN LA LEY DE REGULACIÓN DE CANNABIS MEDICINAL.	37
-NPS COMO ENFRENTAR EL PROBLEMA. EXPERIENCIAS EN URUGUAY.	37
-HAY EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN EL CEREBRO DE USUARIOS CRÓNICOS DE COCAÍNA.	38
-STRATEGIES FOR LC-(HR)-MS-BASED SCREENING APPROACHES	39
-IMPACT OF DRUG-DRUG INTERACTIONS ON THE INTERPRETATION OF CLINICAL OR FORENSIC CASES.	39
-BEST PRACTICES IN POSTMORTEM FORENSIC TOXICOLOGY	39
-NOVEL PSYCHOACTIVE SUBSTANCES: CURRENT TRENDS FROM NMS LABS	40
-MODELS FOR STUDYING THE HUMAN METABOLISM OF NEW PSYCHOACTIVE SUBSTANCES	40
-CRIMEN FARMACÉUTICO: UNA AMENAZA A LA SALUD PÚBLICA MUNDIAL	40
-Development of an analytical method for detection of 16 adulterants in dietary supplements sold in Brazil, using HPLC-DAD	41
-Análisis de la dinámica de consumo y caracterización de las drogas de abuso al interior de la Universidad Nacional de Colombia - sede Bogotá (UN-SB)	41
-Acute intoxication after alternative natural therapy for depression	42
-Desarrollo de metodología cualitativa para la determinación de herbicidas fenoxiácidos en madera mediante extracción QuEChERS y análisis por GC/MS	42
-Screening de nuevas sustancias psicoactivas y cocaína en muestras de orina en fiestas electrónicas en Uruguay.	43
-Determinación de Cobalto en Orina de Caballo por Digestión en Microondas y Espectrometría de Absorción Atómi- ca por Horno de Grafito (GFAAS)	43
-Development and validation of the first method to analysis of NBOMes in dried blood spots (DBS)	44
-Determinación de cobre en huesos de trabajadores fallecidos.	44
-Determination of opiates in real and reference hair samples by solid phase extraction (SPE) and gas chromatog- raphy-mass spectrometry (GC-MS).	45
-Detección de (-)Δ9-THC en saliva por ELISA (Neogen THC ORAL FLUID KIT).	45
-BROMACIL PESTICIDE: DECONTAMINATION PROCEDURE AND QUANTITATIVE DETERMINATION IN HAIR BY LC-MS	46
-Desarrollo de una biblioteca de espectros de masas para compuestos de interés en dopaje empleando derivatización con N-metil, N-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA), a través de cromatografía de gases con impacto electrónico (GC-EI/MS)	46
-ABORDAJE DE CASOS RELACIONADOS CON NUEVAS SUSTANCIAS PSICOATIVAS (NSP)	47
-Estudio del metabolismo in vitro de Metilona (3,4-metilendioximetcatinona) por hongos del género Cunninghamella	47
-Acute intoxication after alternative natural therapy for depression	48
-IDENTIFICACION DE 2,5-DIMETOXY-4-METILANFETAMINA (DOM) Y METABOLITOS EN ORINA HUMANA POR GC/MS	48
-Identificación de plaguicidas mediante extracción en fase sólida dispersiva, en casos de muerte por intoxicación	49
-"METALES PESADOS (ARSÉNICO, PLOMO Y CADMIO) EN AGUA DE CONSUMO Y SU PRESENCIA EN SANGRE EN POBLADORES DEL DISTRITO DE COATA.ENERO-MARZO DEL 2016" "HEAVY METALS (ARSENIC, LEAD AND CADMIUM) IN DRINKING WATER AND ITS PRESENCE IN BLOOD IN THE SETTLERS COATA DISTRICT, JANUARY-MARCH 2016"	49
-"Fatal case by use of Ketamine"	50
-Validación de una metodología analítica para la determinación de benzodiazepinas en matrices biológicas forenses por extracción QuEChERS y LC/MS/MS	50
-Detección de (-)Δ9-THC en saliva por ELISA (Neogen THC ORAL FLUID KIT).	52

XII CONGRESO REGIONAL LATINOAMERICANO DE TOXICOLOGIA FORENSE (TIAFT)

(XII TIAFT LATIN-AMERICAN REGIONAL MEETING)

9-12
NOV 2016

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SAN JOSÉ
COSTA RICA



Expositores

Alain Verstraete
BÉLGICA

Hans Maurer
ALEMANIA

Ester Schellmach
ISRAEL

Carmen Jurado
ESPAÑA

Hee Sun Chung
KOREA

Marc LeBeau
USA

Dan Isenschmid
USA

I ENCUENTRO DE JÓVENES
TOXICOLOGOS
LATINOAMERICANOS (YScLat)



<http://www.tiaft.org/costarica2016/>

tiaft2016cr@gmail.com

 TIAFT

ABORDAJE DE CASOS RELACIONADOS CON NUEVAS SUSTANCIAS PSICOATIVAS (NPS)

Dallos Morantes, Leidy Johanna*, Hernández Duarte, David Andrés*

* Química(o) Farmacéutica(o), Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses – Laboratorio de Estupefacientes – Regional Bogotá. Calle 7ª # 12ª -51. Teléfono: 4069944 Ext. 1423. Bogotá, Colombia.
Correos electrónicos: leidydallos@medicinalegal.gov.co, david.hernandez@medicinalegal.gov.co



Resumen

Las Nuevas Sustancias Psicoactivas (NPS) surgen en éstos tiempo como el reto más grande para los laboratorios oficiales encargados del análisis de drogas. Este trabajo sugiere ser una guía para el correcto abordaje de casos relacionados con NPS. Para ello se utilizaron sustancias referencia a las que se les realizó pruebas de coloración y/o precipitación, así como ensayos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Con estos datos instrumentales se calculó resolución entre sustancias, valor útil para medir si hay o no una óptima separación para la correcta identificación de esta clase de sustancias.



Palabras Clave

Nuevas Sustancias Psicoactivas (NPS); Pruebas orientativas (pruebas presuntivas); Prueba confirmatoria (GC/MS); Resolución.

Abstract

New Psychoactive Substances (NPS) emerge nowadays as the biggest challenge for the official laboratories responsible for drug testing. This work suggests, or pretends to be taken as a guide to approach to cases related with NPS. With this purpose, some drug reference standard were tested with color and or precipitation reactions with some tests, and then were tested by Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC / MS). With these instrumental data, the resolution between substances was calculated, valuable data to measure if there is an optimal separation to the right identification of these type of substances.

Keywords New Psychoactive Substances (NPS), Rapid Testing Methods (Presumptive tests); Confirmatory test (GC/MS); Resolution.

Introducción

La aparición de las denominadas Nuevas Sustancias Psicoactivas (NPS) es una realidad según la información aportada por las estadísticas forenses relacionadas con el análisis de drogas incautadas a nivel mundial, siendo ésta la mayor amenaza relacionada a los problemas del narcotráfico actual. En Colombia la mayoría de NPS son de origen sintético, siendo éste fenómeno fuertemente asociado al uso de estos derivados químicos como sucedáneos de drogas psicoactivas de uso popularmente conocidos: LSD, MDMA, Marihuana, incluso 2C-B.

En el Laboratorio de Estupefacientes regional Bogotá del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses se han detectado en el transcurso de los últimos años varios casos relacionados con Elementos Materiales Probatorios (EMP) asociados a NPS: Ketamina, Metilona, Metcatinona, Etilonona, 6-APB, Yagé, LSD, MDMA, DOB, DOC, 25I-NBOMe, 25B-NBOMe, 25C-NBOMe, 2C-B, TFMPP y Mefedrona.

Debido a la dificultad para la rápida adquisición de estándares de referencia relacionados con esta clase de sustancias y su continua aparición, la resolución de varios casos se ha hecho con base a criterios analíticos referenciados al análisis de drogas por la UNODC(1)(2), SWGDRUG(3) y Microgram (DEA)(3). Conforme a esta información y la suministrada por el Sistema de Alertas tempranas (SAT)(4) del Observatorio de Drogas de Colombia (ODC) el presente trabajo sugiere ser tomado como un tipo de guía para el desarrollo de una metodología que permita abordar este tipo de casos según la idiosincrasia y necesidades de cada uno de los laboratorios encargados de la materia.

Materiales y Métodos

✓ Sustancias de referencia representantes de diversos grupos químicos de NSP: JWH-073, m-CPP, 2C-E, DOI, LSD-25, Mefedrona, DOB, Ketamina, PMMA, 2C-B, Mescalina, Fenciclidina, PMA, Pseudoefedrina y Fenilpropanolamina.

✓ Sustancias debidamente caracterizadas con las que no se cuenta patrón de referencia: Yagé (DMT, Harmina y Harmalina), Metilona, 6-APB, 25I-NBOMe, DOC, 25C-NBOMe, Mescalina, 2C-B, Ketamina y LSD.

✓ Etanol, metanol y solventes adecuados para solubilizar y extraer las sustancias en mención.

✓ Solución de Tetracosano de 1000mg/L como estándar interno.

✓ Reactivos para reacciones preliminares (orientativas): Simon, Dragendorff Marquis, Liebermann, Mandelin, p-dimetilaminobenzaldehído,

✓ Cromatógrafo de gases con detector de masas, Marca Thermo Scientific, Modelo: Trace 1300/ISQ, Serial 713100018.

✓ Cromatógrafo de gases con detector de Masas, Marca: Agilent Technologies, Modelo: 6890N/5973N Serial: US10139069.

✓ Balanza analítica digital Mettler AE200, Clase I Rango de medición: 0.01 g – 200g, d:0,1mg Material volumétrico de vidrio grado analítico.

Para el presente trabajo se utilizaron una serie de sustancias extraídas de diversos casos con las que no se cuentan como estándares de referencia en el laboratorio (Tabla 1, Gráfico 1, 2 y 3), aquellas fueron sometidas a tres métodos cromatográficos preestablecidos en el laboratorio para el análisis de sustancias estupefacientes y relacionadas, y conforme a dichos resultados se crea el método cromatográfico NPSPPH (Tabla 2). Este mismo ejercicio fue realizado para las sustancias referencias (Tabla 3) con las cuales el laboratorio cuenta y además fueran sometidas a un piloto de Pruebas de Identificación Preliminares Homologadas (PIPH) debido a su ausencia de interferentes. Dichas sustancias fueron identificadas por espectrometría de masas (CG/MS) por cotejación de espectros con la librería SWGDRUG(5) más actualizada (Julio 14 de 2016).



Imagen 1. Caso contenido de sustancias psicotrópicas del cual se logran extraer DMT, Harmina, Harmalina y Leptoflorina (Yagé)



Imagen 2. Caso contenido de sustancias psicotrópicas del cual se logra extraer LSD, 25I-NBOMe, 25C-NBOMe y DOC.



Imagen 3. Caso contenido de sustancias psicotrópicas del cual se logra extraer Metcatinona + 6-APB y ketamina (Tabletas de diversos motivos y colores)

SUSTANCIAS EXTRAÍDAS DE CASOS		GRUPO QUÍMICO RELACIONADO	ESTRUCTURA MOLECULAR
Yagé (Ayahuasca)	N,N DMT	Enteogeno derivado de triptamina	<chem>CN(C)CCc1c[nH]c2ccccc12</chem>
	Harmina	β -carbolina	<chem>COC1=CC=C2C(=C1)N(C)C=CN2</chem>
	Harmalina	β -carbolina	<chem>COC1=CC=C2C(=C1)N(C)C=CN2</chem>
	Leptoflorina	β -carbolina	<chem>COC1=CC=C2C(=C1)N(C)C=CN2</chem>
Tabletas de diversos motivos y colores	Metilona	Catinona	<chem>CN(C)C(=O)C1=CC=C2OC1=C2</chem>
	6-APB	Derivado anfetamínico tipo furano	<chem>CNC(C)Cc1ccc2occc2c1</chem>
25I-NBOMe	Feniletilamina sustituida	<chem>CNC(C)Cc1ccc(OC)c(I)c1</chem>	
Ketamina	Derivado de Fenciclidina (Anestésico)	<chem>CN1CCC2(C)CC1(C)C2</chem>	
Mescalina	Enteógeno derivado de feniletilamina	<chem>CNC(C)Cc1cc(OC)c(OC)c(OC)c1</chem>	
2CB	Feniletilamina (derivado de anfetamina)	<chem>CNC(C)Cc1ccc(Br)cc1</chem>	
DOC	Feniletilamina (derivado de metanfetamina)	<chem>CNC(C)Cc1ccc(Cl)c(OC)c1</chem>	
LSD	Ergolina semisintética (triptamina)	<chem>CN(C)C(=O)C1=CC=C2C(=C1)N(C)C=CN2</chem>	

Tabla 1. Características químicas de sustancias sustraídas de casos contentivos de estar contaminados con sustancias psicotrópicas

Nota 1: Las imágenes de estructura molecular fueron tomadas del portal www.wikipedia.com en los diferentes artículos relacionados con las sustancias, excepto las marcadas con *, que fueron tomadas de: Maxwell Gordon, Medicinal Chemistry – A series of monographs – Volime 4-IV. Capítulo Psychotomimetic Agents (Alexander T. Shulgin). Página: 88.

Rampas de temperatura (Horno)			
Rampa	Rata (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (min)
Inicial		100,0	0,30
1	25,0	200,0	4,00
2	35,0	290,0	8,00
3	35,0	300,0	0,50

Tabla 2. Condiciones cromatográficas; de inyección y flujo; y condiciones para la toma de espectros de masas.

Modo de inyección	Split	
Volumen de inyección	1 μ L	
Inlet	Temperatura	250°C
	Flujo Split	25,0mL/min
	Proporción Split	25:01:00
Gas	Helio	
Modo de arrastre	Flujo continuo	
Flujo	1mL/min	

Condiciones para toma de espectro de masas	
Tipo de método	Adquisición general
T° de línea de transferencia	290°C
Modo de ionización	EI
T° de fuente de ionización	230°C
Rango de masas escaneadas	25-600 amu
Dwell o Scan Times	Cada 0,2s

SUSTANCIAS MATERIAL DE REFERENCIA	GRUPO QUÍMICO RELACIONADO	ESTRUCTURA MOLECULAR
Fenilpropanolamina	Feniletilamina (fármaco)	<chem>CC(N)C(O)c1ccccc1</chem>
PMA	Anfetamina sustituida en el anillo	<chem>CC(N)C(C)Cc1ccc(OC)cc1</chem>
Pseudoefedrina	Fármaco precursor para derivados de amfetamina	<chem>CC(N)C(O)Cc1ccccc1</chem>
PMMA	Metanfetamina sustituida en el anillo	<chem>CC(N)C(C)Cc1ccc(OC)cc1</chem>
Mefedrona	Catinona	<chem>CC(N)C(=O)Cc1ccc(OC)cc1</chem>
2C L	Feniletilamina (derivado de amfetamina)	<chem>CC(N)C(C)Cc1ccc(OC)cc1</chem>
m CCP	Piperazina	<chem>C1CCNCC1</chem>
DOB	Feniletilamina (derivado de metanfetamina)	<chem>CC(N)C(C)Cc1ccc(OC)c(Br)c1</chem>
Fenciclidina	Fármaco anestésico	<chem>C1CCN(C1)C2=CC=CC=C2</chem>
DOI	Feniletilamina (derivado de metanfetamina)	<chem>CC(N)C(C)Cc1ccc(OC)c(Br)c1</chem>
JWH 073	Cannabinoide sintético (Familia naftoilindol)	<chem>CCOC(=O)c1ccc2c(c1)c3ccccc3n2</chem>

Tabla 3. Características químicas de sustancias referencia psicotrópicas relacionadas con NSP.

Nota 2: Las imágenes de estructura molecular fueron tomadas del portal www.wikipedia.com en los diferentes artículos relacionados con las sustancias.
 Nota 3: Mescalina, 2CB, Ketamina y LSD-25 se tuvieron en cuenta para estudios posteriores dados a su existencia como material de referencia en el laboratorio.

La selección de dichas moléculas se realiza a partir de la frecuencia con la que este tipo de sustancias son recibidas para análisis, así como la selección de al menos una molécula representativa de los diversos grupos químicos en los que pueden ser clasificadas las Nuevas Sustancias Psicoactivas (NPS)(6)

Resultados

Se realizaron pruebas preliminares sólo sobre las sustancias en las que se constataba su pureza (materiales de referencia) dado que las NPS que se encuentran relacionadas a casos se hallan mezcladas entre sí, y/o con sustancias adulterantes, y/o cortantes que interfieren en dichos tests. Los resultados son expuestos en las siguientes imágenes:

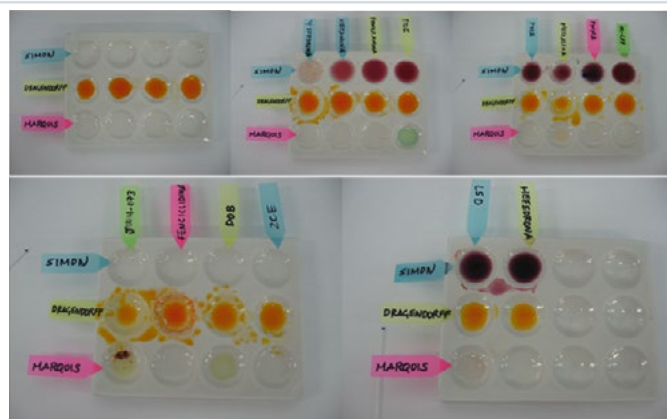


Imagen 4. Blanco de reactivos de pruebas preliminares (Simon, Dragendorff y Marquis) y coloraciones con sustancias referencia a concentración de 100mg/L en etanol.

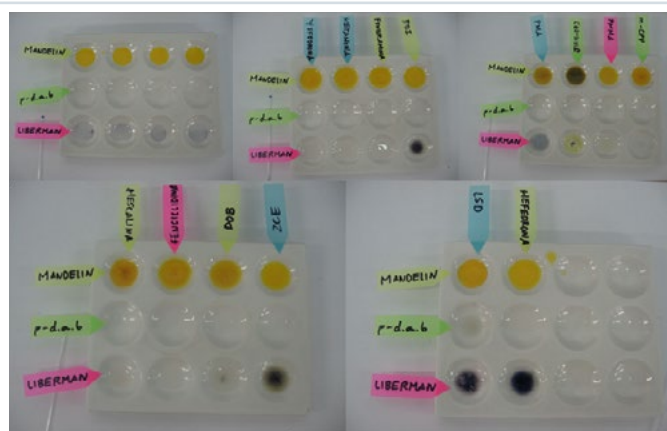


Imagen 5. Blanco de reactivos de pruebas preliminares (Mandelin, p-dimetilaminobenzaldehído y Libermann) y coloraciones con sustancias referencia a concentración de 100mg/L en etanol.

Posteriormente una mezcla de sustancias extraídas de los casos, otra mezcla con las sustancias referencia, y mezclas entre sí, fueron analizadas cualitativamente por los métodos cromatográficos preestablecidos para la cualificación de cocaína, heroína, morfina, cortantes y/o adulterantes (SOLIPPH); amfetaminas y derivados (ANFEPPH); y screening general para sustancias psicotrópicas (LAESBOG). Realizado este acercamiento experimental GC/MS, se procedió a generar un método cromatográfico en el que la aparición, separación e identificación de las sustancias preestablecidas mejorara. Se creó el método cromatográfico NPSPPH a partir del método SOLIPPH (Imagen 6, Tabla 4 e Imagen 7). En la Imagen 6 se logra evidenciar la no identificación de Harmalina, DOC y LSD atribuido al proceso de dilución al que fueron sometidos durante el proceso de mezclado. En la Tabla 4 e Imagen 7 se muestra un ejemplo de los datos utilizados para el análisis de resolución entre sustancias referencia.

File : C:\msdchem\1\DATA\160C27\MEZCLA-CASOS-N.D
 Operator : DAHD
 Acquired : 28 Oct 2014 3:55 using AcqMethod NPSPPH.M
 Instrument : GC-MS 6890N-5973N
 Sample Name: MEZCLA-CASOS-N
 Misc Info :
 Vial Number: 98

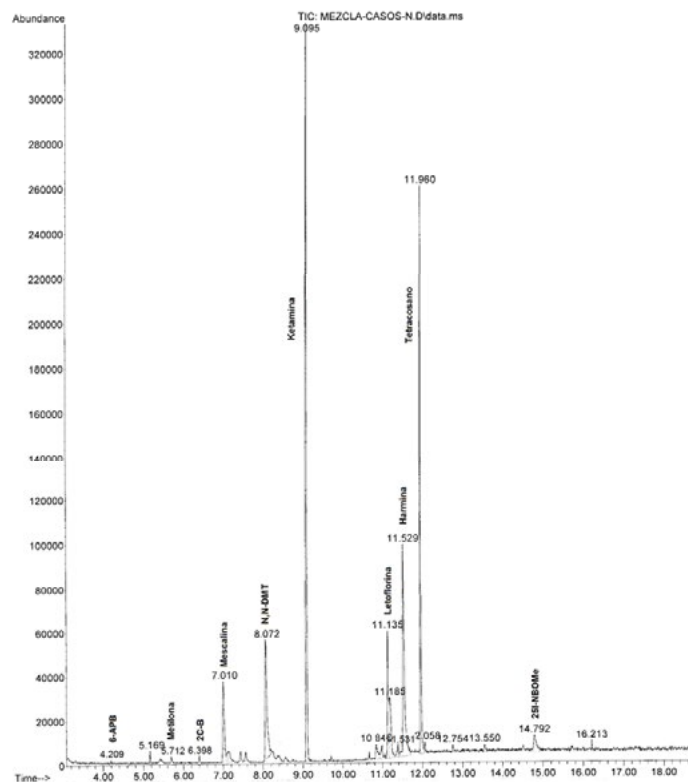


Imagen 6. Cromatograma de mezcla de sustancias asociadas a casos por NPSPPH

Tiempo de retención		Área		T1		T2	
Tetracosano	Fenclidina	Tetracosano	Fenclidina	Tetracosano	Fenclidina	Tetracosano	Fenclidina
11,849	9,293	25323882	23930949	11,808	9,227	11,929	9,395
11,847	9,294	24908729	24048038	11,802	9,243	11,924	9,395
11,852	9,291	25022377	23731970	11,818	9,227	11,926	9,379
11,854	9,292	24665505	23539638	11,813	9,227	11,931	9,384
11,848	9,286	24734352	23409831	11,813	9,221	11,921	9,395

Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio
11,850	9,291	24930969,000	23732085,200	11,811	9,229	11,926	9,390

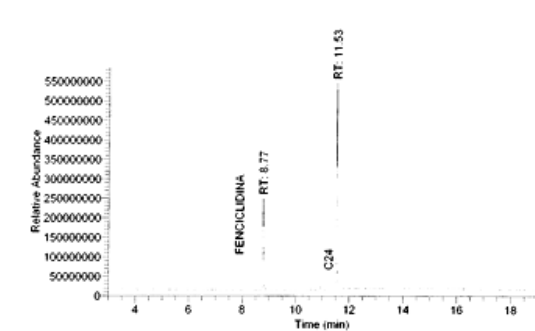
Desviación estándar	Desviación estándar	Desviación estándar	Desviación estándar	Desviación estándar	Desviación estándar	Desviación estándar	Desviación estándar
0,003	0,003	260940,628	264696,378	0,006	0,008	0,004	0,008

RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD
0,025	0,034	1,047	1,115	0,051	0,089	0,033	0,081

Ancho de banda
0,161

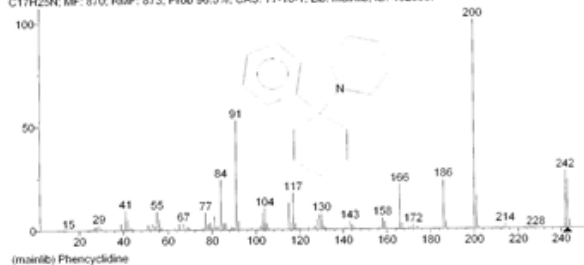
Tabla 4. Ejemplo de datos tomados de diferentes inyecciones de estándar de Fenclidina con su estándar interno en cromatógrafo de gases con detector de masas, Marca: Agilent Technologies, Modelo: 6890N/5973N utilizando método NPSPPH

FECHA DE ADICION: 1/26/2014
 NOMBRE: FENCICLIDINA 100-4
 PIVA: 100 mg/L en EtOH
 METODO INSTRUMENTAL: Cromatografía de GC/MS
 METODO: FID
 ESPECTROMETRO: Agilent 6890N
 SERIAL: 507014020
 RESPONSABLE: J. J. de la Cruz
 RT: 8.77 SM: -B



NL
 5.87E8
 TIC MS
 Genomic
 FENCICLI
 INA-100-4

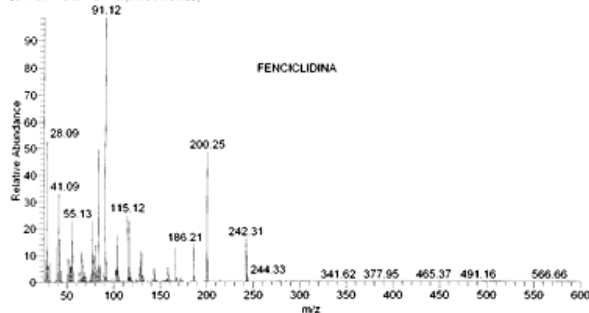
Hit 1: Phencyclidine
 C17H25N, MF: 870, RMF: 873, Prob 96.5%, CAS: 77-10-1, Lib: mainlib, ID: 162599.



(mainlib) Phencyclidine



FENCICLIDINA-100-A #1597 RT: 8.77 AV: 1 NL: 3.07E7
 I: 11.53 + 6 El File: ms (2500-691.00)



Name: Phencyclidine
 Formula: C₁₇H₂₅N
 MW: 243 Exact Mass: 243.1967 CAS#: 77-10-1 NIST#: 352151 ID#: 162599 DB: mainlib
 Other DBs: FINE, RTECS, HODOG, IRDB
 Contributor: NIST Mass Spectrometry Data Center
 10 largest peaks:
 200.999 | 91.525 | 242.274 | 84.241 | 186.236 | 243.232 | 166.214 | 117.176 | 201.157 | 115.128 |
 Synonyms:
 1 Piperidine, 1-(1-phenylcyclohexyl)-
 2.Cl-395
 3.HOG
 4.1-(1-Phenylcyclohexyl)piperidine
 5.Phenicylidine
 6.Angel dust
 7.Cl-395
 8.PCP

Imagen 7 Cromatograma, espectro de masas y cotejamiento con librería SWGDRUGS para sustancia referencia, Fenciclidina a 100mg/L en etanol.

Por este nuevo método se analizaron diluciones de 100mg/L de cada una de las sustancias referencia junto al estándar interno (tetracosano) y se calcula promedio de tiempos de retención (tR), promedio de áreas, y ancho de banda promedio (W). Con estos datos se calcula ancho de pico y posterior resolución (Rs) entre sustancias. A continuación se muestran los resultados de algunos parámetros relevantes para el análisis cualitativo de dichas sustancias (Tabla 5 y 6).

Tabla 5.
 tR promedio y ancho de banda calculado para sustancias referencia por método NPSPPH en cromatógrafo Agilent Technologies, Modelo: 6890N/5973N

Sustancia	tR promedio	Ancho de banda
Fenilpropanolamina	4,35	0,21
PMA	4,592	0,27
Pseudoefedrina	4,631	0,18
PMMA	4,9018	0,23
Mefedrona	5,0126	0,12
2C-E	6,5152	0,21
Mescalina	6,8342	0,15
m-CCP	7,3718	0,16
2C-B	8,1868	0,21
DOB	8,2868	0,17
Ketamina	8,9384	0,13
Fenciclidina	9,2912	0,16
DOI	9,3682	0,19
JWH-073	18,0204	0,27
LSD	Indetectable	Indetectable

Tabla 6.
 Valor de resolución entre sustancias contiguas calculada según ecuación $R_s = (tR_2 - tR_1) / (0.5(W_2 + W_1))$

Resolución entre...	Valor
Fenilpropanolamina-PMA	1,03
PMA-Pseudoefedrina	0,17
Pseudoefedrina-PMMA	1,33
PMMA-Mefedrona	0,65
Mefedrona-2CE	9,22
2CE-Mescalina	1,77
Mescalina-m-CPP	3,48
m-CPP-2CB	4,39
2CB-DOB	0,51
DOB-Ketamina	4,22
Ketamina-Fenciclidina	2,39
Fenciclidina-DOI	0,44
DOI-JWH-073	38,39



Preámbulo para la descripción y abordaje de los casos relacionados con NPS:

1. Descripción de empaque primario y secundario en el que se encuentra la evidencia
2. Descripción morfológica de la matriz de la sustancia contentiva:

a. Para papel troquelado secante: Estado de la evidencia, descripción de imágenes observadas allí, medición por dosis en milímetros, conteo del número de dosis, peso bruto de las matrices dado el caso de cuantificación.

b. Para comprimidos: Estado de los comprimidos, descripción de la imagen y forma impresas en las tabletas, medida aproximada de tabletas en milímetros, número de dosis, peso bruto de la matriz sin empaques de ser necesaria una cuantificación.

c. Para polvos diluidos: Estado del material pulverulento, descripción de textura y color, determinación de peso bruto del polvo, establecimiento de peso neto de estupefaciente de ser necesaria una cuantificación.

Nota 4: En todos los casos se sugiere separar las matrices según sus características morfológicas y tratar como sub-evidencias, ya que estas sustancias pueden ser de diferente tipo.

3. Realizada la descripción se procederá a ejecutar las pruebas orientativas de coloración y/o precipitación según restricciones de cantidad de muestra. Se sugiere describir coloración inicial, y cambio del mismo en el tiempo (Ej. Azul que tiende a violeta intenso)

4. Se hayan realizado o no las pruebas orientativas, se procede al análisis por GC/MS de la evidencia, para ellos se busca un solvente adecuado que logre solubilizar los analitos de interés por el método cromatográfico desarrollado.

5. Se concluirán los datos cotejados con sustancias referencias (si se cuentan con ellas) o los identificados por las librerías apropiadas para el análisis de NPS previa interpretación de resultados.

Pruebas preliminares orientativas:

Las pruebas PIPH son pruebas orientativas para la identificación de sustancias y drogas sometidas a fiscalización por la Ley 30 de 1986(7) y que están adscritas al proyecto AD/COL/98/C58 firmado entre Naciones Unidas, Fiscalía General de la Nación y entes gubernamentales encargados del

análisis de sustancias controladas por dicha ley. Estas pruebas son referidas como pruebas de coloración y/o precipitación

bibliográficamente sustentadas en los tratados del análisis químico orgánico cualitativo.

Las pruebas de Dragendorff, Simon y p-dimetilaminobenzaldehído son pruebas que orientativamente consideramos importantes para el abordaje de NPS dado que nos podrían indicar la presencia de un alcaloide, de aminos secundarios

(útil para la identificación de derivados de metanfetamina) o de derivados del indol (como el LSD), respectivamente. En segunda instancia encontramos las pruebas de Marquis, Liebermann y Mandelin, las cuales ofrecen una diversidad de colores dependiendo de las sustancias a las que son sometidas. Estas pruebas pueden ser de gran utilidad para orientar el caso según las coloraciones reportadas por la literatura. El éxito de todas estas pruebas depende de la pureza en la que se encuentre el analito de interés y su concentración en la matriz.

El uso adecuado de éstas pruebas está íntimamente ligado a la cantidad de muestra suministrada para el análisis, por tanto, si la cantidad para realizar total o parcialmente estas pruebas es limitada se sugiere pasar directamente a los ensayos confirmatorios instrumentales.

Pruebas preliminares orientativas:

La confirmación de las sustancias mencionadas en las Tablas 1 y 3 se realizó a través de metodología analítica GC/MS utilizando como librería referente la SWGDRUG, la cual se encuentra bien alimentada con espectros de masas tomados a diversas NPS y que además es de gratuito acceso.

Confirmadas las sustancias por separado y en mezcla se procedió a realizar un análisis más profundo respecto a la resolución de las sustancias entre sí a una concentración de 100mg/L, como se evidencia en la Tabla 6.

Según los datos allí suministrados se logra evidenciar una resolución óptima para las parejas contiguas en tiempos de retención, exceptuando las duplas PMA-Pseudoefedrina, PMMA-Mefedrona, 2CB-DOB, Fenciclidina-DOI, en las que el valor de resolución se encuentra por debajo de 1, es decir, que hay aproximadamente una sobreposición de los picos mayor al 3%. Los valores superiores de resolución superior a 1,5 refieren una sobreposición aproximada al 0,2%, es decir, una resolución completa. (8)

Teniendo en cuenta lo dicho se encuentra que de las 91 posibles duplas entre las 14 sustancias detectadas a 100mg/L solo 4 presentarían un sobreposición que puede afectar su identificación. Por tanto se encuentra que tan solo el 4,4% de las posibles duplas podrían afectar el análisis. Se considera que la probabilidad de encontrar alguno de estos pares de sustancias en un mismo caso puede ser baja, pero si se enfrenta a este caso se sugiere someter cambios en la metodología cromatográfica para que se logre afectar la separación de los picos en tales tiempos de retención.

Durante estos ensayos se logra evidenciar según la Tabla 5 que el LSD a una concentración de 100mg/L no puede ser detectado por los equipos GC/MS utilizados, por tanto se considera buscar su límite de detección en una concentración superior a ésta.

Referencias

1. Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (UNODC). Métodos recomendados para la identificación y el análisis de las catinonas sintéticas en los materiales incautados. Sección de Laboratorio y Asuntos Científicos. Viena. Enlace: https://www.unodc.org/documents/scientific/STNAR49_Synthetic_Cathinones_S.pdf. Consultado (2016-09-22)
2. Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (UNODC). Métodos recomendados para la identificación y el análisis de los agonistas de los receptores de cannabinoides sintéticos en los materiales incautados. Sección de Laboratorio y Asuntos Científicos. Viena. Enlace: https://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic_Cannabinoids_Sp.pdf
3. Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG). SWGDRUG Recommendations, Version 7.1. Enlace: <http://swgdrug.org/Documents/SWGDRUG%20Recommendations%20Version%207-1.pdf>. Consultado (2016-10-28)
4. Observatorio de Drogas de Colombia (ODC). Sistema de Alertas Tempranas (SAT). Enlace: <http://www.odc.gov.co/SAT>. Consultado (2016-10-28)
5. Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG). SWGDRUGS Mass Spectral Library. Enlace: <http://swgdrug.org/ms.htm>. Consultado (2016-09-09)
6. Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (UNODC). UNODC Early Warning Advisory on New Psychoactive Substances. Enlace: <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS> (2016-10-28)
7. ESTATUTO NACIONAL DE ESTUPEFACIENTES. LEY 30 DE 1986 (Colombia). "Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Estupefacientes y se dictan otras disposiciones". Consultada del enlace: http://www.descentralizadrogas.gov.co//pdfs/politicas/nacionales/Ley_30_de_1986.pdf (2016-10-28)
8. Repositorio Institucional de la Universidad de Alicante. Cromatografía. Principios generales. Enlace: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8246/7/T2cromagraf.pdf> Consultado (2016-10-25)
9. United Nations International Drug Control Programme. Vienna. Rapid Testing Methods of drugs abuse. Manual for use by National Law Enforcement and Narcotics Laboratory Personnel. New York, 1994. Enlace: <https://www.unodc.org/pdf/publications/st-nar-13-rev1.pdf>. Consultado (2016-10-28)
10. Martin Hansen. Design and Synthesis of Selective Serotonin Receptor Agonists for Positron Emission Tomography Imaging of the Brain. PhD thesis. Faculty of Pharmaceutical Sciences. University of Copenhagen.
11. Sebastian Leth-Petersen. Correlating the Metabolic Stability of Psychedelic 5-HT_{2A} Agonists with Anecdotal Reports of Human Oral Bioavailability. Neurochem Res DOI 10.1007/s11064-014-1253-y
12. Simon D. Brandt. Analytical characterization of bioactive N-benzyl-substituted phenethylamines and 5-methoxytryptamines. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2015, 29, 573-584
13. Kaitlyn E Toole*, Shanlin Fu, Ronald G Shimmon, Nadine Kraymen. Color Tests for the Preliminary Identification of Methcathinone and Analogues of Methcathinone. Microgram Journal, Volume 9, Number 1

Conclusiones

El presente documento sugiere ser una guía para cumplir con los objetivos de investigación y resolución de casos asociados al análisis forense de NPS. El abordaje de casos asociados a NPS debe permitir una correcta identificación de las mismas con ayuda de las pruebas orientativas preliminares y pruebas confirmatorias. Se sugiere que los laboratorios generen sus propias metodologías analíticas conforme a las necesidades de cada nación.

La descripción detallada de los elementos probatorios y su óptima separación en sub-evidencias es un detalle que siempre se debe tener en cuenta para el abordaje de los casos. De igual forma siempre se debe estimar la cantidad de muestra con la que se cuenta, ya que ahí se decide si se hacen pruebas orientativas o se pasa directamente a las confirmatorias.

El valor calculado de resolución entre sustancias nos da un indicio de las condiciones cromatográficas que se deben tener en cuenta para llevar a cabo una óptima separación de sustancias. Se sugiere preparar soluciones de 100mg/L de sustancias referencia tipo NPS con las que cuente el laboratorio, a partir de allí se pueden realizar estudios de límite de detección.

FENITOÍNA EN SALIVA:

CUANTIFICACIÓN POR FPIA Y SU APLICACIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.

(Phenytoin saliva: Quantification by FPIA and their application in clinical practice)

González Isabel Inés Ramona*, Suárez Héctor Andrés, Odierna Edgar Roger, Rivolta Susana Elvira, Hansen Cristian.
Hospital de Niños de la Santísima Trinidad. Ferroviarios 1250. B. Crisol. CP: 5000. Córdoba. Argentina.
TE 0351-4586480 int 587. Mail: iirgonzalez@yahoo.com.ar



Resumen

La Fenitoína (DFH) es utilizada para el tratamiento de las convulsiones. La gran variación en la relación dosis/concentración, la dificultad en ajustar la dosis y la existencia de toxicidad dosis-dependiente evitable, hace recomendable monitorizar los niveles en los pacientes tratados con DFH. Tiene estrecho rango terapéutico, establecido en 10-20 ug/mL en plasma siendo la fracción libre 1-2 ug/mL representando un 10%. La concentración en saliva se corresponde con la concentración libre en plasma y es utilizada para el monitoreo de drogas anticonvulsivantes. La determinación de DFH se realiza por métodos cromatográficos e inmunológicos. El objetivo del trabajo consiste en valorar el Inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA) para la determinación de DFH y correlacionar las concentraciones plasmáticas y salivales de la misma e implementar el uso de saliva en el control y seguimiento de los pacientes tratados.



Palabras Clave

Fenitoína, monitoreo de drogas en saliva, FPIA. Correlación saliva/plasma.

Material y Métodos. FPIA en saliva se valoró con pruebas según las normas y procedimientos requeridos por el Organismo Argentino de Acreditación. Se analizaron 122 muestras de saliva y 84 de plasma. Resultados. El método fue lineal en un intervalo entre 0.31 y 10 ug/mL. Los CV% obtenidos oscilaron entre 1.78 % y 12% y los bias entre 0.23 a 2.91 ug/mL. Los Límite de Detección y Cuantificación fueron de 0.15 ug/mL y 0.41 ug/mL, respectivamente. Se realizó una comparación de FPIA vs HPLC obteniéndose la siguiente ecuación $FPIA = 1.17 * HPLC + 0.13$, $r^2: 0.90$. Las relaciones DFH saliva/plasma oscilaron entre 0.069 y 0.147 con una media de 1.07, representado un 10.7 % de la concentración plasmática.

Conclusión: El método de FPIA demostró poseer una especificidad y sensibilidad adecuada para la determinación de DFH en saliva. Se comprobó la relación entre DFH en saliva y plasma, brindando una herramienta adicional para el monitoreo de pacientes tratados con DFH en nuestro hospital.

Abstract

Phenytoin (DFH) is used for the treatment of seizures. The large variation in the relation dose/concentration, the difficulty in adjusting the dose, and the existence of a dose-dependent toxicity that may be avoidable, makes it advisable to monitor DFH levels in patients treated with the drug. The drug has a narrow therapeutic range established in 10-20 ug/mL in plasma being the free fraction 1-2 ug/mL, which represents about the 10%. The saliva's concentration corresponds to the free plasma concentration. Saliva is used for monitoring of anticonvulsant drugs. DFH determination is performed by chromatography and immunological methods. The aim of this study was to evaluate the fluorescence polarization immunoassay (FPIA) for the determination of DFH and to correlate plasma and salivary concentrations to implement the use of saliva in the control and monitoring of patients.

Keywords

Phenytoin drug monitoring in saliva, FPIA. Relation saliva/plasma.

Material and Methods. FPIA in saliva was assessed with tests according to the standards and procedures required by the Argentine Accreditation Agency. A total of 122 saliva samples and 84 plasma samples were analyzed. Results. The method was linear on the range between 0.31 and 10 ug/mL. The CV% obtained ranged from 1.78% to 12% and the bias between 0.23 to 2.91 ug/mL. The limit of detection and quantification were 0.15 ug/mL and 0.41 ug/mL, respectively. A comparison of FPIA vs. HPLC was performed following the following equation $FPIA = 1.17 * HPLC + 0.13$, $r^2 0.90$. The relationship of DFH saliva/plasma ranged between 0.069 and 0.147, with a mean of 1.07, represented a 10.7% of the plasmatic concentration.

Conclusion: The FPIA method proved to have adequate sensitivity and specificity to determine DFH in saliva. A relationship between salivary and plasma DFH was found, providing an additional tool for monitoring patients treated with DFH in our hospital.

Introducción

La Fenitoína (DFH) es utilizada para el tratamiento de las convulsiones tónico-clónicas generalizadas y parciales, primarias y secundarias en todas las edades. Ejerce su actividad anticonvulsiva debido a que limita la activación repetitiva de los potenciales de acción evocados por la despolarización de las neuronas de la médula espinal. Este efecto es mediado por la velocidad de recuperación de los canales de sodio voltaje- dependientes a través su inactivación. A diferencia de otros anticonvulsivantes no produce sedación a nivel del SNC. (1) Tiene alta variabilidad farmacocinética, se une el 90 % a la albúmina; su concentración en LCR y saliva se corresponde con la concentración libre (10 %), pero la concentración cerebral es similar a la plasmática debido a acumulación; la concentración en la leche es el 25-50% de la plasmática. Una vez absorbida se encuentra en gran parte en forma no ionizada, siendo muy liposoluble por lo que difunde fácilmente dentro de todos los tejidos incluyendo el SNC. Se elimina casi totalmente por hidroxilación en el microsoma hepático (> 95 %), reacción que se satura con concentraciones por encima de 10 ug/mL dando lugar a una cinética dosis-dependiente (no lineal) de tipo Michaelis-Menten. Esto a su vez lo hace un fármaco susceptible de importantes interacciones con otros fármacos, que compitan con él por los sitios de unión a la albúmina, generando fenómenos de desplazamiento y alteraciones en la fracción libre, o a nivel de metabolismo retrasando o aumentando la eliminación de los fármacos que interactúan. Es un fármaco de estrecho rango terapéutico, establecido en 10-20 ug/mL, y como se deduce de su unión a la albúmina, de 1-2 ug/mL desde el punto de vista de la fracción libre (10%) del fármaco. Debido a lo expuesto anteriormente, además de la gran variación en la relación dosis/concentración, la dificultad en ajustar la dosis y la existencia de una toxicidad dosis-dependiente evitable, hace recomendable monitorizar los niveles séricos en todos los pacientes tratados con DFH. (2, 3, 4, 5, 6). Este monitoreo permite principalmente: individualizar la dosis de un paciente, controlar la falta de eficacia y/o toxicidad. (7, 8, 9, 10). Si bien lo habitual es medir la concentración de DFH en plasma, en las últimas décadas ha sido de gran interés el uso de la matriz saliva para el monitoreo de algunas drogas anticonvulsivantes. La concentración de éstas drogas en saliva es utilizada para estudios de farmacocinética, farmacodinámica y monitoreo de drogas de varios desórdenes convulsivos. (11, 12, 13, 14, 15). Esta matriz, no sólo puede ser obtenida fácilmente y en múltiples ocasiones con

mínimas molestias al paciente, sino, que además los niveles salivales reflejan la concentración de droga libre en plasma, responsable del efecto farmacológico. (6, 11, 16, 17, 18). En pacientes con alteraciones renales, hepáticas o co-medicados con otros fármacos como por ejemplo salicilatos o ácido valproico (que reducen la unión a albúmina de DFH), la concentración total puede ser baja en relación con la libre, por lo que resulta de gran utilidad medir las concentraciones plasmáticas libres o los niveles salivales de DFH, los cuales reflejan la concentración de la droga farmacológicamente activa. Existe una relación entre la concentración de la droga en plasma y en saliva que puede ser utilizada para el seguimiento y control de los pacientes medicados con DFH. La proporción de DFH en saliva vs plasma según algunos autores es de aproximadamente 0.1. Esta relación se modifica en aquellos pacientes en donde por algún motivo la fracción libre plasmática cambia debido a estados fisiológicos, como el embarazo o estados fisiopatológicos como disminución de proteínas plasmáticas o alteraciones hepáticas y/o renales. Los rangos establecidos para los valores de DFH libre en plasma son de 1-2 ug/mL. (6, 11, 16, 17). Para la determinación de DFH plasmática se utilizan métodos cromatográficos e inmunológicos. Los primeros requieren de aparatología costosa y son laboriosos, demandan tiempo a la hora de obtener un resultado, además de la experiencia necesaria del analista, mientras que los segundos son menos costosos, no requieren el entrenamiento del analista y son más rápidos a la hora de obtener un resultado. Ambos métodos poseen especificidad y sensibilidad adecuada, sin embargo los cromatográficos son más específicos y tienen la ventaja de poder cuantificar también los metabolitos de la DFH, a diferencia de los inmunológicos que sólo detectan la DFH. Los inmunoensayos son extremadamente sensibles pero detectan reacciones cruzadas en algunas ocasiones con sustancias cuya estructura química es similar, por ejemplo, con los principales metabolitos de DFH 5-(4-hidroxifenil)-5-fenilhidantoina (p-HPPH) y p-HPPH glucurónido (11, 15, 19, 20, 21, 22). Por lo expuesto anteriormente el objetivo del presente trabajo consiste en valorar el Inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA) con la matriz saliva para la determinación de DFH disponible en nuestro hospital, con el objetivo de correlacionar las concentraciones plasmáticas y salivales de DFH para implementar una matriz alternativa para el control y seguimiento de los pacientes tratados con este fármaco.

Materiales y Métodos

✓ Para valorar el método FPIA con la matriz saliva se llevaron a cabo pruebas según las normas y procedimientos requeridos por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA-05) en el marco de acreditación de laboratorios según norma ISO 17025 para el cambio de matriz de un método validado en plasma (23, 24).

En este estudio se analizaron 122 muestras de saliva y 84 muestras de plasma. De la primer matriz, 84 muestras se utilizaron para el estudio de correlación y 38 para los ensayos de selectividad y especificidad del método FPIA. Las muestras de plasma se utilizaron para el estudio de correlación.

Para los estudios de precisión, linealidad, límite de detección y de cuantificación se utilizaron estándares de DFH en saliva, preparados en el Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba, Argentina a partir de la droga sólida.

Preparación de estándares de saliva:

Se prepararon con DFH sólida provistas por Sigma Aldrich (Argentina). Se recolectó un pool de salivas a partir de voluntarios sanos sin ningún tipo de medicación. La saliva se obtuvo sin estimulación, mediante torundas de algodón, posteriormente el fluido fue extraído de la torunda mediante la presión con una jeringa, recolectando todo el contenido en un tubo de plástico tipo eppendorf, que luego fue centrifugado y el sobrenadante utilizado para los estudios respectivos. Con el material recolectado se prepararon 8 estándares de DFH en saliva de concentración conocida, siendo estas las siguientes: 0.0-0.156-0.312-0.625-1.25-2.5-5.0-10.00 ug/mL que luego fueron utilizados para los distintos ensayos de linealidad, precisión, límite de detección y de cuantificación

Estudio de linealidad:

Se elaboró una curva de calibración donde se utilizaron los estándares de saliva de concentración conocida. Se midió cada estándar por cuatuplicado utilizando FPIA. La recta de regresión se obtuvo graficando la concentración de los estándares conocidos en función a la concentración de DFH obtenida por el método FPIA.

Estudio de Precisión:

Se tomaron los datos del análisis por cuatuplicado de los distintos estándares de saliva preparados y se calculó el desvío estándar (DE) y el coeficiente de variación porcentual (CV%) a cada nivel de concentración

Límite de detección (LD) y de cuantificación (LQ):

Se midió 10 veces un blanco de saliva y se calculó el desvío estándar. Con estos datos según IUPAC se calculó el $LD = 2 \times t_{1-\alpha, n} \times S_0$ y $LQ = 10 \times S_0$. Donde S_0 es la desviación estándar de un blanco y $t_{1-\alpha, n}$ es el factor de Student para una probabilidad de 0.05 y n grados de libertad. El valor de t se obtuvo de una tabla de probabilidades y correspondió a 1.8331 con la probabilidad antes mencionada. (25).

Estudio de Interferencia

Se agregaron distintos anticonvulsivantes como: Ácido Valproico, Carbamacepina y Fenobarbital en una concentración de 3.75 ug/mL, 2 ug/mL y 16 ug/mL respectivamente, a un estándar conocido de 25 ug/mL de DFH en saliva. Se analizó por FPIA el estándar sin agregado y con agregado de los interferentes con un $n=10$. Se aplicó un test t para muestras apareadas para el análisis de los resultados.

Estudio de selectividad y especificidad:

Treinta y ocho muestras de saliva de pacientes medicados con DFH, se analizaron por duplicado por cromatografía líquida (método considerado en este trabajo como referencia) y FPIA. La determinación de saliva por HPLC se realizó según método modificado (21). De acuerdo a las siguientes condiciones cromatográficas: Cromatógrafo Agilent 1100 con detector de arreglos de diodo (HPLC- DAD), coeficiente de variación de 10 %. La determinación de saliva se realizó por FPIA en un equipo Axsym tecnología Abbot. Los reactivos fueron provistos por Abbot laboratorios y se los utilizó según especificaciones y procedimientos recomendados por el fabricante (26). Para evaluar los parámetros antes mencionados se realizó un análisis de regresión lineal.

Correlación de DFH en plasma y saliva por FPIA

Para realizar el estudio de correlación se recolectaron los resultados de 84 muestras remitidas al laboratorio del centro hospitalario con indicación para el dosaje de DFH en saliva y plasma simultáneamente por FPIA.

Criterios de exclusión: muestras que carecían o tenían, función renal, hepática o concentración de proteínas plasmáticas y albúmina alteradas, muestras con escaso material de saliva o plasma, muestras con valores de DFH por debajo del límite de detección. Todos los resultados de los parámetros antes mencionados se analizaron mediante el programa estadístico InfoStat versión estudiantil 2008.

R e s u l t a d o s

LINEALIDAD

La recta de regresión para pendientes e interceptos indicaron, valores estadísticamente diferentes a cero ($p < 0.0001$), para ambos parámetros. Se podría establecer una linealidad con pendiente positiva y un intervalo de trabajo entre 0.31 y 10 ug/mL. La ecuación de ajuste obtenida fue la siguiente: $Y = 1.24 X + 0.36$. La linealidad se puede observar en la figura n° 1.

PRECISIÓN Y EXACTITUD

Los resultados de los estudios de precisión y exactitud arrojaron los siguientes DE, Bías y CV% que se muestran en la tabla N°1.

LIMITE DE DETECCIÓN (LD) Y DE CUANTIFICACIÓN (LC).

Se puede establecer que el LD para el método estudiado y de acuerdo a lo calculado según IUPAC es 0.15 ug/mL mientras que el LQ: 0.41 ug/mL. En la tabla N°2 se muestran los desvíos y promedios de los resultados.

INTERFERENCIA

Los resultados mostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la muestra del estándar de DFH de 2.5 ug/mL de saliva con el agregado y sin el agregado de los anticonvulsivantes descriptos anteriormente. ($p = 0.11$).

SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD

Para evaluar los parámetros mencionados se realizó una comparación de FPIA vs HPLC y se obtuvo la siguiente ecuación de la recta por cuadrados mínimos con sus coeficientes de correlación.

$$FPIA = 1.17 * HPLC + 0.13 \quad r: 0.95 \quad r^2: 0.90$$

La pendiente como la ordenada al origen se encuentran dentro de parámetros estadísticamente significativos ($p = 0.1863$ y $p < 0.0001$ respectivamente). En la figura N°2 se puede apreciar la relación existente entre ambos métodos.

ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SALIVA Y PLASMA POR FPIA

Del total de muestras recolectadas sólo se pudieron analizar un total de 36 muestras de plasma y saliva. La media y desvío estándar de DFH fueron los siguientes: 10.7 ± 0.80 y 0.109 ± 0.080 expresados en ug/mL respectivamente. Las proporciones de DFH en saliva y plasma oscilaron entre 0.069 y 0.147 con una media de 1.07, representado un 10.7 % de la concentración plasmática. Según el análisis de regresión se puede apreciar que entre las matrices existe una relación lineal con pendiente positiva, estadísticamente distinta de 0 ($p < 0.0001$) y una constante igual a 0.09 estadísticamente igual a 0 ($p = 0.458$). La ecuación resultante fue la siguiente: $Y = 0.09X + 0.09$ con un $r^2: 0.88$, donde Y representa las concentraciones de DFH en saliva y X las concentraciones de DFH en plasma. Los resultados se pueden observar en la figura N3.



Según nuestros resultados, la determinación de DFH en saliva por FPIA tiene una linealidad adecuada con un rango de trabajo que va desde 0.31 a 10 ug/mL, que incluye ampliamente los valores de referencia establecidos para la concentración de DFH en saliva que van de 1-2 ug/mL (6, 11, 16, 17) Los ensayos de interferencia mostraron que no existe reacción cruzada o interferencia significativa, con las drogas que habitualmente se co-administra la DFH. En la comparación de métodos se observa que el método FPIA mide con un error constante de 0.13 ug/mL y un error proporcional de 1.17 ug/mL respecto del HPLC, método considerado en este trabajo como de referencia. Según otros autores también coinciden en que los métodos inmunológicos arrojan valores ligeramente superiores a los obtenidos por HPLC (11). Los LD y LC determinados para este método son adecuados para las concentraciones de DFH encontradas en saliva. La aplicación del método FPIA mostró que existe una relación entre los niveles de DFH en saliva y plasma y ésta puede utilizarse para el monitoreo de DFH. (4). Se observó que el porcentaje de DFH en saliva fue en promedio de 10.7% de la concentración de DFH plasmática, en condiciones de función renal, hepática y proteínas plasmáticas normales coincidiendo con las distintos trabajos publicados (15, 18, 27). Es de esperar que la relación o el porcentaje de droga libre se modifique al cambiar algunos de los parámetros biológicos antes mencionados, para lo cual sería útil seguir a los pacientes en tratamiento farmacológico, con la concentración de DFH en saliva, que estaría reflejando la fracción de DFH farmacológicamente activa:

Conclusiones

El método de FPIA demostró poseer una especificidad y sensibilidad adecuada la determinación de DFH en saliva en nuestro hospital, siguiendo los pasos requeridos según el Organismo Argentino de Acreditación (OAA-05) para producir un cambio de matriz en el método utilizado, en este caso plasma por saliva. Se pudo demostrar que el método FPIA para la determinación de la concentración de DFH en saliva, es rápido, sensible y específico al ser comparado con el método HLPC-DAD método considerado de referencia.

Además se comprobó la relación existente entre DFH en saliva y plasma por FPIA, brindando una herramienta adicional para el monitoreo de pacientes tratados con DFH.

La metodología puede utilizarse para el control y seguimiento de pacientes epilépticos ya que brinda beneficios, mejorando la calidad de vida del paciente durante su tratamiento.

Std DFH ug/mL	DFH FPIA ug/mL	DE ug/mL	Bias ug/mL	CV %
0.0	0.39	0.038	0.39	9.79
0.16	0.39	0.049	0.23	12.86
0.31	0.66	0.065	0.35	9.81
0.62	1.37	0.155	0.74	11.36
1.25	2.13	0.062	0.88	2.93
2.5	3.25	0.101	0.75	3.12
5.0	6.32	0.155	1.32	2.45
10.0	12.91	0.230	2.91	1.78

Tabla 1. Datos de análisis de precisión y exactitud

STD DFH (ug/mL)	DFH FPIA (ug/mL)
0	0.43
0	0.36
0	0.37
0	0.29
0	0.41
0	0.36
0	0.34
0	0.42
0	0.38
0	0.37

Tabla 2. Desvíos y promedios de estudio de LD y LC

Promedio: 0.37 ug/mL
 DE: 0.041 ug/mL
 CV: 11%

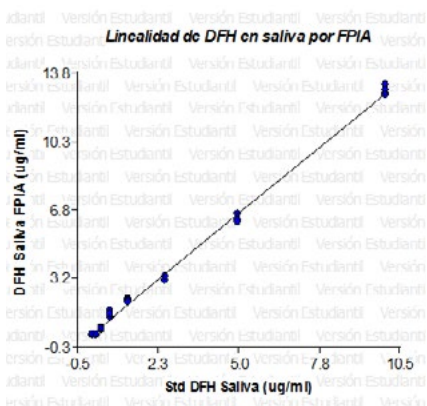


Figura 1. Linealidad de DFH por FPIA en saliva

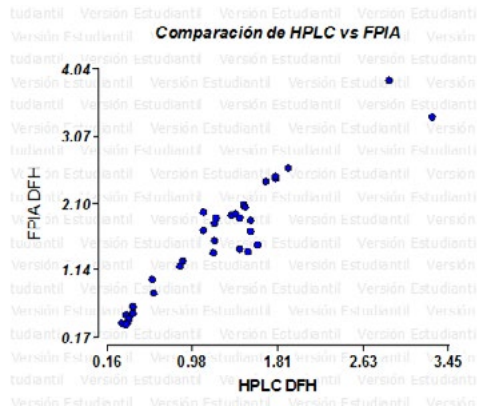


Figura 2. Comparación de métodos HPLC-DAD y FPIA a

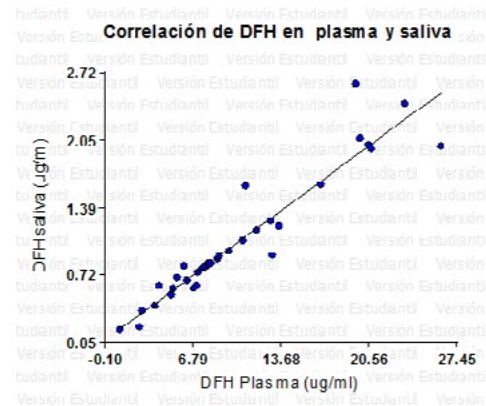


Figura 3. Correlación de DFH en plasma y saliva

Referencias

- 1Mc Namara J. Farmacoterapia de las epilepsias En: Bruton L, Lazo J, Parker K, editores. Goodman E Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 11 ed, en español, México, 2007.p 501-25.
- 2Zhou S, Changli C, Xue-Qing Y, Chunguang L and Guangji W. Clinically Important Drug Interactions Potentially Involving Mechanism-based Inhibition of Cytochrome P450 3A4 and the Role of Therapeutic Drug Monitoring Ther Drug Monit. 2007; 29:687-710.
- 3Saiz Diaz R, Sancho J and Serratos J. Antiepileptic Drug Interactions. The Neurologist 2008, (14): 6S:555-65.
- 4Touw D, Neef C, Thomson A, and Vinks A. Cost-Effectiveness of Therapeutic Drug Monitoring: A Systematic Review. Ther Drug Monit, 2005, 27, (1):10-17.
- 5Svein I, Landamark C. Antiepileptic Drug Interaction-Principles and Clinical Implications Current Neurophatology, 2010, 8:3:254-267
- 6Nurt M, Anderson D, Kloss J, Apfle F. Evidence-based Implementation of Free Phenytoin Therapeutic Drug Monitoring. Clin Chem 2000;46:8:1132-1135.
- 7Fukuoka, N., Uno J., Tsukamoto T., Houchi H., Kimura M., Morita S. Dose Adjustment of Phenytoin for Comedication in Japanese Patients With Epilepsy. Ther Drug Monit 2009;31:57-62
- 8Aldaz A. et al. Monitorización farmacocinética de antiepilépticos. Farm Hosp 2011
- 9Soldin O, Soldin S. Review Therapeutic Drug Monitoring in Pediatrics. Ther Drug Monit 2002; 24:1-8
- 10Martín-Calderón JL, Varona J, Espina LM. Monitorización de niveles plasmáticos de fenitoína. Rev Diagn Biol [revista en Internet]. 2001 Jun [citado 2013 Ago 22]; 50(2): 65-69. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732001000200001&lng=es
- 11Liu H, Delgado M. Therapeutic Drug Concentration Monitoring Using Saliva Samples Focus on Anticonvulsants. Clin Pharmacokinet 1999; 36 (6): 453-470.
- 12Miles MV, Tennon M, Greenwood R. Evaluation of the Ames Seralyser for the determination of carbamazepine, phenobarbital and phenytoin concentrations in saliva Ther Drug Monit 1990;12:501-10
- 13Mucklow J. The use of saliva in therapeutic Drug monitoring Ther Drug Monit 1982;4: 229-247.
- 14Horning M, Brown L, Nowlin J, et al. Use of saliva for therapeutic drug monitoring. Clin Chem 1977;23: 157-164
- 15Patsalos P, Berry D. Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs by Use of Saliva. Ther Drug Monit 2013;35: 4-29)
- 16Grim S, Ryan M, Miles M, Tang P, Strawsburg T, Fakhoury T, Baumann R. Correlation of levetiracetam Concentrations Between Serum and Saliva. Ther Drug Monit 2003;25:61-66.
- 17Gorodischer R, Burtin P, Hwang P, et al. Saliva versus blood sampling for therapeutic Drug Monitoring in children: patient and parenteral preferences and an economic analysis. Ther Drug Monit 1994; 16:437-43.
- 18Levy R, Schmidt D. Utility of Free Level Monitoring of Antiepileptic Drug. Epilepsia, 1985, 26:3:199-205
- 19Mullangi R, Agrawal S, Srinivas N. Measurement of xenobiotics in saliva: is saliva an attractive alternative matrix? Case studies an analytical perspectives. Biomed Chromatogr 2009, 23:3-25.
- 20Pirjo L. Analytical Techniques for Drug Detection in Oral Fluid. Ther Drug Monit 2008, 30:2p 181-187.
- 21Sawchuk R, Catier L. Liquid-Chromatographic Methods for Simultaneous Determination of Phenytoin and 5-(4-Hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin in plasma and urine. Clin Chem 1980;26:7:835-839.
- 22Chamerlain R, Stafford D, Majjub A, McNatt B. High-Pressure Liquid Chromatography and Enzyme Immunoassay Compared with Gas Chromatography for Determining Phenytoin. Clin Chem 1977;23:9:1764-1766.
- 23MC-OAA : Manual de la Calidad del OAA: vigente.
- 24International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis – IUPAC Technical Report – Pure & Appl Chem, Vol. 74, Nº 5, pp.835-855 (2002).
- 25International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including detection and quantification capabilities IUPAC recommendations 1995 – Pure & Appl Chem, Vol. 67, Nº 10, pp.1699-1723 (1995).
- 26Hermida J, Bóveda M, Vadillo J, Tutor J. Comparison between the Cobas Integra immunoassay and a high-performance liquid chromatography for therapeutic monitoring of carbamazepine. Clinical Biochemistry, 2002. Vol 35, p 251-254.
- 27Paxton J, Rowell F, Ratcliffe J, et al. Salivary phenytoin radioimmunoassay. Eur J Clin Pharmacol. 1977;11:71-4.

HAIR TESTING FOR ANABOLIC DRUGS: A COMPENDIUM OF RESULTS .

Pascal Kintz 1,2,*

1: X-Pertise Consulting 84 route de Saverne 67205 Oberhausbergen, France
pascal.kintz@wanadoo.fr 2: Institut de Médecine légale 11 rue Humann
67000 Strasbourg, France (* author for correspondence)



Abstract

In contrast with urine, hair analysis has a wide window of detection, ranging from weeks to months, depending on the length of the hair shaft, and provides information concerning the pattern of an individual's drug abuse. The Society of Hair Testing has published on 16 June 1999, a consensus opinion on the use of hair in doping situations but hair analysis is not yet recognized by the World Anti-Doping Agency (WADA), although this technology is accepted in most courts of Justice.

While analysis of urine specimens cannot distinguish between chronic use or single exposure, hair analysis makes this distinction. This is very useful in case of identification in urine of restricted compounds. The major application may be in identifying false-negatives, since neither abstaining from a drug for a few days nor trying to "beat the test" by diluting urine, will alter the concentration in hair. Urine does not indicate the frequency of drug intake in subjects who might deliberately abstain for several days before screening. Doping during training and abstinence during the competition can therefore be detected, as athletes cannot evade the test. hair testing should not be considered as an alternative to urinalysis but only as a complement in positive case to document the claim of the athlete, and it must be clear that in case of positive urine results, the negative hair result cannot exclude the administration of the detected drug and cannot overrule the positive urine result.

In this compendium, 17 positives results from 73 requests for anabolic drugs testing in hair are presented. Boldenone (10 and 29 pg/mg), stanozolol (17-1992 pg/mg), methandienone (14-2800 pg/mg), methyltestosterone (12 and 22 pg/mg), clenbuterol (39 and 97 pg/mg), nandrolone (4-50 pg/mg), 19-norandrostenedione (4-13 pg/mg) and mesterolone (7 pg/mg) were identified during routine practice.



Keywords

Anabolic drugs, steroids,
hair, doping

I n t r o d u c t i o n

The use of stimulants (amphetamine, ephedrine, strychnine ...) in sport to improve performances was reported in the early 1900'S. The Medical Commission of the International Olympic Committee (IOC) established in 1967 the first list of prohibited substances and methods and adopted a Medical Code to protect the health of athletes and to ensure respect for the ethical concepts implicit in fair play, the Olympic spirit and medical practice. More recently, and after the Tour de France in 1998, the concerns in doping resulted in the formation of the World Anti-Doping Agency (WADA). The current rules governing doping in sport have as their core that a doping violation is deemed to occur on finding in a body fluid a prohibited substance, a metabolite of a prohibited substance or a compound chemically or pharmacologically related to a prohibited substance. In most cases, urine is the specimen of choice, but recombinant human erythropoietin and related compounds or hormones can be detected in blood. To date, hair is not accepted in doping control, although France passed in 2001 a law allowing biologists to use this matrix to document doping (décret n° 2001-35 from 11 January 2001). The major practical advantage of hair testing compared to urine or blood testing for drugs is that it has a larger surveillance window (weeks to months, depending on the length of the hair shaft, against 2-4 days for most xenobiotics). For practical purposes, the two tests complement each other. Urinalysis and blood analysis provide short-term information of an individual's drug use, whereas long-term histories are accessible through hair analysis. While analysis of urine and blood specimens cannot distinguish between chronic use or single exposure, hair analysis can offer the distinction. Use of anabolic steroids was officially banned in the mid-1970s by sports authorities. The first control of anabolic steroids (particularly metandienone found in Dianabol®) was achieved in Montreal in 1976 during the Olympic games. Anabolic steroids are detectable in urine only 2 to 4 days after exposure, except for the ester forms. Anabolic steroids are prohibited, their presence in a urine sample lead to a positive result except for endogenous steroids (testosterone, epitestosterone, DHEA, nandrolone which have threshold of positivity). In hair, the parent compound is the target analyte, that is the opposite to urine where the metabolites are of interest. Only few papers dealing with the detection of anabolic drugs in human hair have been published (1-5), mostly focused on analytical procedures or focussed to a single compound. Therefore, it was our opinion to add some results to share with the scientific community.

Between September 2014 and September 2016, this office received 73 hair specimens with a view to assessing if there is any evidence of historical anabolic drugs abuse by the donor of the sample. The items were received sealed and the chain of custody was intact. The samples were logged onto the system and processed at the laboratory. At the request of the solicitor, the hair was examined, with the aid of scientific support staff for 19-norandrostenedione, mesterolone, methyl testosterone, DHEA, DHT, methenolone, THG, stanozolol, testosterone and esters, nandrolone and esters, methandienone, boldenone, clenbuterol and salbutamol over fixed period by the client. Self-reported drug consumption was not known. The use of cosmetics and hair sprays or lotions was sometimes indicated but cannot be considered as a general rule.

From 73 hair specimens, 21 were body hair (mainly chest hair, but also leg or under arm hair). The influence of the gender was not considered of importance and was not always provided.

All analyses were achieved under ISO17025 accreditation, using a previously published method (3), recently modified.

Briefly, 50 mg of finely cut hair was weighted. Internal standards were added together with methanol for a two hour ultrasonic bath. Then, in one side, the organic phase was evaporated and diluted with phosphate buffer pH 6.8 (part A), and in another side, the hair remain was incubated with NaOH 1 M to be melted (part B). Liquid-liquid extractions were operated on parts A and B with ethyl acetate. The aqueous A phase was isolated and NaOH 1 M added before extraction with ethyl acetate. The three organic phases were combined and purified on NH₂ cartridge. The final phase was evaporated and diluted with ethyl acetate to be divided in two parts : for injection onto GC-MS/MS apparatus (TSQ 8000) after evaporation and TMS derivatization, and for injection onto LC-MS/MS apparatus (TSQ Quantum) after evaporation and dilution with methanol.



Extensive chromatographic procedures (two purification steps by solid-phase and liquid-liquid extractions, MS-MS detection) were analytical prerequisites for successful identification of anabolic steroids in hair due to the low target concentrations.

Testosterone and DHEA were always detected at physiological concentrations (lower than 10 and 15 pg/mg, respectively), confirming our previous studies (6, 7). Normal concentrations of testosterone in hair are generally lower than 10 pg/mg, irrespective of the anatomical location of sampling (head or body hair) and the gender, although the concentration in the hair of women is generally in the very low pg/mg range. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a steroid hormone naturally produced by the adrenal glands and the ovaries. It can be converted into other hormones, including oestrogen and testosterone. In head hair, normal concentrations are < 15 pg/mg for both males and females. There is a debate among the scientific community on the cut-off value for DHEA in hair and a cut-off at 50 pg/mg is recommended. It has been demonstrated that DHEA accumulates in body hair, with concentrations up to 10000 pg/mg, even in subjects with no history of steroids abuse (8).

Athletes use both endogenous (testosterone, DHEA) or exogenous (nandrolone, stanozolol, mesterolone ...) anabolic steroids because it has been claimed that they increase lean body mass, increase strength, increase aggressiveness and lead to a shorter recovery time between workouts.

Seventeen positives results from 73 requests (23.2 %) were obtained. This was lower than the previous rate (37.2 %) in our first series of data (9). No positive result was challenged by the donor of the specimen. Boldenone (10 and 29 pg/mg), stanozolol (17-1992 pg/mg), methandienone (14-2800 pg/mg), methyltestosterone (12 and 22 pg/mg), clenbuterol (39 and 97 pg/mg), nandrolone (4-50 pg/mg), 19-norandrostenedione (4-13 pg/mg) and mesterolone (7 pg/mg) were identified during routine practice (Table 1).

The measured concentrations of stanozolol, methandienone, methyltestosterone, and clenbuterol, are in the range of previous database (5). Therefore, the measured concentrations can be used as reference. It appears that the combination of stanozolol and methandienone was frequent.

Nandrolone was detected in 3 cases. Nandrolone is metabolized to norandrosterone (NA) and noretiocholanolone (NE). Other 19-norsteroids, such as 19-norandrostenedione or 19-norandrostenediol, classified as anabolic androgenic steroids by the WADA are available over-the-counter or through the Internet and have the

same metabolites as nandrolone. Although norandrostenediol and norandrostenedione are banned by the WADA, there is a great need in forensic science and for survey of the athletes, to discriminate nandrolone from other 19-norsteroids. This is obviously not possible in urine, as the metabolites are common. Hair analysis allows to identify the exact nature of the parent compound (eg, nandrolone, norandrostenediol or norandrostenedione, in case of positive urine for NA > 2 ng/ml), as it has been accepted by the scientific community that the parent compound is the major analyte that is incorporated in hair. Thus, hair analysis would discriminate nandrolone abuse from over-the-counter preparations containing 19-norsteroids.

There are essentially 3 types of problems with urinalysis drug testing: false-positives, degradation of observed urine collection and evasive manoeuvres, including adulteration. These problems can be greatly mitigated or eliminated through hair analysis. It is always possible to obtain a fresh, identical hair sample if there is any claim of a specimen mix-up or breach in the chain of custody. This makes hair analysis essentially fail-safe, in contrast to urinalysis, since an identical urine specimen cannot be obtained at a later date. Clearly, hair analysis can thus function as a "safety net" for urine analysis.

Another potential use of hair analysis is to verify accidental or unintentional ingestion of drinks or food that has been laced with drugs. In case of a single use, the hair will not test positive, particularly for anabolic drugs that are badly incorporated in hair. Its greatest use, however, may be in identifying false-negatives, since neither abstaining from a drug for a few days or nor trying to "beat the test" by diluting urine will alter the concentration in hair. Urine does not indicate the frequency of drug intake in subjects who might deliberately abstain for several days before biomedical screenings. While analysis of urine specimens cannot distinguish between chronic use or single exposure, hair analysis can make this distinction.

Although hair is not yet a valid specimen for the International Olympic Committee or the World Anti-Doping Agency, it is accepted in most courts of justice in the world. A key issue is that some conflicting results are observed, all involving athletes that tested positive in urine in accredited WADA laboratories and negative in hair in forensic certified laboratories.

Conclusion

It appears that the value of hair analysis for the identification of drug users is steadily gaining recognition. This can be seen from its growing use in pre-employment screening, in forensic sciences and in clinical applications. Hair analysis may be a useful adjunct to conventional drug testing in doping control. Specimens can be more easily obtained with less embarrassment, and hair can provide a more accurate history of drug use.

In case of doping control, drugs are screened in urine specimens according to validated standard operating procedures in accredited laboratories. As forensic laboratories can be involved in testimony dealing with doping agents, the idea of using hair for doping control has emerged as hair analysis has been accepted in court in other cases. Courts can request additional information on the pattern of use of doping substances, such as during the 1998 cycling Tour de France where blood, urine, and hair were simultaneously collected. Hair can both confirm repetitive abuse and identify the exact nature of the parent compound. Moreover, long-term use (over several months) of restricted compounds (only authorized under specific conditions and for a short period), such as salbutamol or corticoids, can be documented through hair analysis. The determination of testosterone esters in hair should allow a definitive unambiguous confirmation of the administration of exogenous testosterone.

However, the relationship between urine and hair results is not yet established and negative hair result does not mean « no doping ».

References

1. Scherer CR, Reinhardt G. Nachweis sechs endogener Steroide in menschlichen Haaren mit GC/MS und Isotopenverdünnungsanalyse. In Althoff H (éditeur) Abstract from 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin. Aachen 1995: 55.
2. Thieme D, Grosse J, Sachs H, Mueller RK. Analytical strategy for detecting doping agents in hair. *Forensic Sci Int* 2000;107: 335-45.
3. Gaillard Y, Vayssette F, Baland, Pépin G. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric determination of anabolic steroids and their esters in hair. Application in doping control and meat quality control. *J. Chromatogr B*. 1999;35: 189-205.
4. Deng XS, Kurosu A, Pounder DJ. Detection of anabolic steroids in head hair. *J Forensic Sci*. 1999;44: 343-6.
5. Kintz P. Detection of doping agent in human hair. In Kintz P (éditeur) *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*. Boca Raton : CRC Taylor & Francis 2006 : 241-54.
6. Kintz P, Jeanneau T, Cirimele V, Ludes B. Identification of testosterone and testosterone esters in human hair. *J Anal Toxicol*. 1999;23: 352-6.
7. Kintz P, Cirimele V, Ludes B. Physiological concentrations of DHEA in human hair. *J Anal Toxicol*. 1999;23: 424-8.
8. Kintz P, Jeanneau T, Cirimele V, Ludes B. Pharmacological criteria that can affect the detection of doping agents in hair. *Forensic Sci Int* 2000; 107: 325-34.
9. Kintz P, Vayssette, F, Deveaux M. Compendium of results from hair tested for anabolics. *Toxicol Anal Clin* 2014;26: 197-200.

Case	Type of hair	Segment	Results (pg/mg)
1	head	0-1.5 cm	stanozolol: 1002 / methandienone: 2800
2	head	0-2.5 cm	stanozolol: 26 / methandienone: 61
3	head	0-1 cm	stanozolol: 30 / methandienone: 33
4	head	0-3 cm	methandienone: 28
5	head	0-3 cm	stanozolol: 17 / methandienone: 39
6	head	0-1 cm	stanozolol: 1992 / methandienone: 2006
7	head	0-3 cm	19-norandrostenedione: 4
8	body	whole length	clenbuterol: 39
9	body	whole length	stanozolol:1020 / methandienone:20 / boldenone:29
10	head	0-3 cm	stanozolol : 152 / clenbuterol: 97
11	head	0-3 cm	nandrolone : 4 / 19-norandrostenedione: 8
12	head	0-2.5 cm	stanozolol : 18 / methandienone : 20
13	body	whole length	stanozolol : 28 / methandienone : 92
14	head	0-4 cm	methandienone : 14
15	head	0-2 cm	nandrolone: 50
16	head	0-2 cm	19-norandrostenedione: 13 / nandrolone: 11 / methyltestosterone: 12
17	head	0-2 cm	boldenone :25 / 19-norandrostenedione:9 nandrolone:9 / methyltestosterone:22 / mesterolone:7

Table 1. Compendium of positive analytical findings after testing 73 hair specimens



CANNABIS MEDICINAL:

POTENCIAL APLICACIÓN COMO MEDICAMENTO Y RIESGOS QUE ENTRAÑAN SU USO.

Revisión actualizada

Luis Alberto Ferrari 1,2 y Leda Giannuzzi1,3

¹Profesores de Toxicología Avanzada y Química Forense de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nac. de La Plata²Lic. en Química, Lic. en Cs Farmacéuticas, Doctor en Cs Exactas UNLP, Espec Consultor Toxicología-Revisor UNODC, Naciones Unidas³Doctora en Ciencias Químicas-Mg Toxicología-Investigadora Principal de CONICET. Argentina. e-mail: lferrari@biolunlp.edu.ar

"No podremos cambiar el mundo pero si el precio que pagamos por intentar transformarlo"

LAF

Introducción.

Si bien el cannabis sp ha sido utilizado por diferentes civilizaciones y culturas a través de los siglos, tanto como materia prima textil y producto terapéutico en ciertas dolencias, jamás despertó reacciones tan encontradas y debates tan acalorados como en esta última década.

¿Es realmente un fármaco eficaz, estigmatizado arbitrariamente por muchos y criminalizado injustamente por los gobiernos? ¿Posee comprobada eficacia terapéutica y se encuentra al mismo tiempo sujeta a muchos efectos adversos? Sus defensores, ¿lo promueven detrás de una pantalla engañosa, bajo el escudo del uso compasivo para ciertas patologías, con el objeto de lograr que los parlamentos deroguen su estatus de inutilidad médica y por ende retirarlo de las listas de sustancias prohibidas, facilitando de este modo el consumo recreativo?

Parecería que se ha instalado en el pensamiento del ciudadano común, que ha llegado la hora de definir si el cannabis debe dejar de ser una sustancia prohibida o bien resulta esto un planteo extemporáneo y debe permanecer proscrita.

Estas y muchas otras cuestiones se gatillan a la hora de debatir el estado actual del conocimiento científico, respecto al verdadero potencial del cannabis sp para uso medicinal a partir de los últimos resultados alcanzados por estudios científicos, publicadas en revistas arbitradas y conducidas por reconocidos investigadores internacionales.

Adicionalmente, incluimos un breve ítem sobre el uso recreacional, no médico, porque entendemos que algunas formas de consumo, tal como el fumado, es aplicada en ciertas terapias que se mencionan en este escrito y los efectos adversos además de los riesgos referidos para el uso recreacional son muy similares a los observados en la administración del cannabis fumado en personas que sufren determinadas patologías.

En esta breve revisión nos centraremos principalmente en las investigaciones sobre el uso terapéutico del cannabis en aquellas enfermedades, tal como las epilepsias refractarias y como adyuvante de los protocolos quimioterápicos en enfermedades oncológicas, glaucoma y en esclerosis múltiple. Asimismo comentaremos los fundamentos vertidos en los proyectos de Ley presentados ante la Honorable Cámara de Diputados de la Nación, a la luz del conocimiento científico.

Este escrito pretende contribuir a un debate objetivo, basado en el conocimiento científico, no en lo anecdótico, folclórico o en base a opiniones de páginas web que aportan visiones sin referencias científicas comprobables. De este modo entendemos aportar material para el debate en el Parlamento y en el conjunto de la Sociedad.

2. Uso recreativo del cannabis

En Los Estados Unidos, la encuesta del NIDA-NIH: Monitoring Future Survey de 2014, informó que en los estados donde se legalizó la marihuana, el 40% de los jóvenes asistentes al High school habían usado cannabis, mientras que solo lo hacían el 26% de jóvenes provenientes de los estados en la que se encuentra hoy proscrita. El estudio indicó además, que solo el 16.4% piensa que el cannabis puede presentar un alto riesgo para el consumidor (Miech et al 2014). El dato no es menor, frente al argumento de quienes sostienen que el prohibicionismo ha conducido al aumento de consumidores y al mayor tráfico de drogas de uso indebido.

Tal como señala Volkow et al (2014, **el contenido de THC, o la potencia de la marihuana, como se detectó en muestras confiscadas, ha sido cada vez mayor, desde aproximadamente 3% en la década de 1980 al 12% en 2012** (ElSohly, 2014). Este aumento en el contenido de THC en la planta de Cannabis resulta preocupante debido a los efectos psicoactivos derivados de su uso. Ello se visualiza en los aumentos significativos de las consultas a centros de emergencia por parte de personas consumidoras así como el aumento en los accidentes vehiculares fatales (Wong et al, 2014). Este incremento de la potencia de THC a través del tiempo también plantea preguntas acerca de los estudios anteriores sobre los efectos del uso de marihuana, en especial los estudios crónicos, que evaluaron resultados a largo plazo.

Los estudios epidemiológicos, neurobioquímicos y médicos de los últimos diez años (muy en especial el último lustro) coinciden en afirmar que el consumo de marihuana es nocivo para el hombre. Existen otros deterioros además de la afectación neurocognitiva, como lo es la coordinación motora que trae aparejado un desmejoramiento importante en la capacidad de conducir vehículos bajo su efecto y el riesgo de enfermedades psicóticas o esquizofrenia en adolescentes y adultos jóvenes. Estudios previos realizados por Kendell en 2003 indicaron que no podía aseverarse un nexo causal entre el consumo de marihuana y la esquizofrenia en usuarios adolescentes habituales. Esta postura fue superada por estudios epidemiológicos longitudinales realizados recientemente en varios países, a la luz de los últimos hallazgos neurobioquímicos.

En efecto, el consumo de marihuana y el nexo causal con psicosis o esquizofrenia, fue abordado en la contribución multidisciplinaria de especialistas del Youthdale Child and Adolescent de la Universidad de Cambridge, UK y las Universidades de Toronto - Health Network en Canadá publicada en diciembre de 2010 (Shapiro & Buckley Hunter, 2010). Destacamos en este trabajo las siguientes reflexiones:

Arsenault et al. 2002, presentaron sus conclusiones (basándose en un estudio longitudinal realizado en Nueva Zelanda) estableciendo que los consumidores de Cannabis menores de 15 años eran cuatro veces más

propensos a desarrollar esquizofrenia a la edad de 26 años. Además, el dato proveniente de niños de 11 años permitió a los autores establecer el control de síntomas psicóticos en ese momento. Es de destacar que en este estudio, un 10% de los consumidores de cannabis (adolescentes de 15 años de edad) desarrollaron trastorno esquizofreniforme a la edad de 26 años. Estas investigaciones recientes definitivamente niegan la ambigüedad previa atribuida al papel etiológico del cannabis en la esquizofrenia. El cannabis es también la droga más común en las personas con esquizofrenia. Esto pone de relieve la complejidad de la interacción entre esquizofrenia y uso de cannabis, que puede ser aclarada mediante estudios epidemiológicos longitudinales.

Los estudios longitudinales realizados en cinco países (Grecia, Israel, los Países Bajos, Nueva Zelanda y Suecia), han proporcionado fuerte evidencia de una **relación de causalidad entre el consumo de cannabis y la esquizofrenia**. En ese sentido, el estudio de Weiser et al. 2002 que incluyó a 270 mil adolescentes de sexo masculino, de los cuales 50.413 fueron interrogados específicamente después del inicio del consumo de drogas. Los resultados indicaron que el uso indebido de esta droga en la adolescencia elevó a más del doble la tasa de hospitalizaciones por esquizofrenia. Asimismo, el estudio realizado en Grecia indicó que la exposición temprana a cannabis en la adolescencia "puede aumentar el riesgo subclínico en aspectos negativos y positivos de la psicosis".

Lo anterior fue concordante con el estudio de McGrath et al, 2010 los cuales concluyeron que "el consumo temprano de cannabis se asocia con la psicosis desarrollada posteriormente en los adultos jóvenes". Este concepto complementa y hacen suyos los estudios epidemiológicos previos que citan.

No nos extendemos demasiado en el punto, ya que no es objeto de esta revisión. Solo señalar que un uso masivo, indiscriminado, podría confundir a jóvenes y adolescentes, razonando que si una sustancia es terapéutica, bien puede consumirse con fines no médicos, recreativos, sin mayores riesgos. Aquí amerita plantear estrategias para la información o educación de los adolescentes y adultos jóvenes con el objeto de revertir la percepción errónea de inocuidad en el fumado de cannabis.

Las afirmaciones consignadas provienen de informes epidemiológicos realizados con adolescentes por grupos de investigación muy prestigiosos (Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, Holanda, Australia, Nueva Zelanda, Israel, entre otros). Mencionamos algunas referencias para los interesados en profundizar este aspecto (Cfr. Hall & Degenhardt, 2009; Shapiro & Buckley Hunter, 2010; Hartman & Huestis, 2013; Volkow et al, 2014; Bossong et al 2014, Ammerman et al, 2015; Desrosier et al, 2015; Hall, 2015; Ramaekers et al. 2016).

3.El uso medicinal del cannabis a través del tiempo

Si bien el Cannabis es considerado originario de Asia Central, algunos investigadores creen que podría provenir del sur del mar Caspio o sur y centro de Rusia o bien, la región del Cáucaso. El cannabis es uno de los más antiguos psicotrópicos conocidos por la humanidad. Los inicios de su utilización por el hombre son difíciles de rastrear, ya que se cultiva y consume mucho antes de la aparición de la escritura. Conforme a descubrimientos arqueológicos, se ha conocido en China al menos desde el Neolítico, alrededor de 4000 AC. El emperador de China, Shen Nung, fue el primero en describir las propiedades y usos terapéuticos del cannabis, en su compendio de hierbas medicinales chinas escritas en 2737 AC. Poco después se esparció a la India y luego al norte de África y llegó a Europa hacia el año 500 de nuestra era. Existen registros de su uso en numerosas civilizaciones antiguas, donde se utilizaba en ciertas afecciones, inclusive describiéndose algunos efectos nocivos, como también lo había consignado originalmente el emperador chino.

En 1525, los españoles trajeron la marihuana a América y los ingleses la introdujeron en Jamestown en 1611, donde se volvió una cosecha comercial importante a la par del tabaco y se cultivó como fuente de fibra.

En los inicios de la era científica, hacia 1839, fue William O'Shaughnessy, médico y cirujano británico, quien descubrió las propiedades estimulantes del apetito, antieméticas y relajantes musculares del cannabis. Posteriormente y hacia fines del siglo XIX y comienzos del XX, se prescribía en Estados Unidos para varias dolencias como dolores de parto, náusea y reumatismo. Su uso recreativo era común desde los años 1850 a 1930. Una campaña llevada a cabo en los años 1930 por el Bureau Federal de Narcóticos de los Estados Unidos presentó a la marihuana como una sustancia adictiva que llevaba a los consumidores a una adicción. En la década de 1950 fue accesorio a la generación "beat" y en los 60 la usaron los estudiantes universitarios y los "hippies" volviéndose un símbolo de rebeldía contra la autoridad. La convención de 1961 de Naciones Unidas, la incluyó dentro del listado de sustancias narcóticas bajo control. En la década de los 90 el estado de Colorado despenaliza al Cannabis con fines médicos, aunque años después se decidió su liberación con fines recreativos, y por fuera de la prohibición federal que continúa hasta hoy. Otros estados de los EEUU (una veintena) han despenalizado su uso con fines médicos. Sin embargo, algunos de esos estados, hoy están contemplando liberarlo con fines recreativos (vg, Estado de Washington). Hacia fines de 2013, la RO del Uruguay legalizó el comercio del Cannabis, donde el estado regula y controla la venta; siendo así, el primer país en legalizar la producción y venta de marihuana. En 2014, Chile autorizó a un municipio cosechar Cannabis con el fin de producir aceite de marihuana para pacientes con cáncer. A comienzos de 2015 autorizaron el cultivo de Cannabis con fines medicinales y de investigación. En estos momentos el país se encuentra discutiendo su despenalización, incluso con fines recreativos. La

situación en otros estados Latinoamericanos es dispar. Hay algunos países reacios a su despenalización; otros en cambio abogan por despenalizarla pero con un control estricto por parte del estado.

Ben Amar (2006) describe en su revisión algunas investigaciones recientemente publicadas sobre el Cannabis aplicado a diversas dolencias. No obstante, la revisión fue escrita hace unos diez años y el conocimiento adquirido en esta última década ha permitido mejorar la comprensión de la fisiopatología de los componentes más importantes del vegetal y sus productos de extracción.

Este investigador efectuó una revisión ordenada de los estudios sobre Cannabis aplicados a diversas patologías, consignando datos interesantes sobre su potencial eficacia, como asimismo efectos adversos y la necesidad de programar investigaciones con mayor número de individuos y estudios más detallados, observación constante que emerge de los trabajos consultados por los autores de esta revisión. Textualmente, al final del artículo expresa: "Sin embargo, basándose en los datos disponibles, **los cannabinoides orales** (se refiere principalmente al THC y al CBD) **no deben ser utilizado como antieméticos de primera línea.** Pueden, sin embargo, resultar eficaces para el tratamiento de la emesis refractaria y tienen su lugar como adyuvantes a otros medicamentos antieméticos. **No hay suficiente evidencia sobre la eficacia del Cannabis y sus derivados en el control de la epilepsia. Ensayos clínicos adicionales, bien diseñados, cuidadosamente ejecutados, son esenciales para definir con claridad el papel de los cannabinoides como estimulantes del apetito, así como en el tratamiento de la esclerosis múltiple, lesiones de la médula espinal, síndrome de Tourette y glaucoma.**

Para cada patología, queda por determinar qué tipo de cannabinoides y vía de administración son las más adecuadas para maximizar los efectos beneficiosos de cada preparación y reducir al mínimo la incidencia de reacciones indeseables.

Hoy día, se ha instalado en la población la idea que el Cannabis no resulta dañino a la salud, confrontándosele a lo sumo con el daño que entraña el fumado de tabaco. Mucho menos cuestionable que este último, dado que dicho vegetal ostenta cierta reputación terapéutica en el pasado. Entendemos que esta forma de razonar, nos retrotrae a etapas de conocimiento pre científico, en que prevalecían la especulación y la deducción. Hoy pasamos a tiempos en el cual se procede en forma más sustentada, es decir, con soportes firmes basados en ciencia pura, para dejar de lado la visión aérea de los hechos. Estas prácticas pasadas no estaban exentas de riesgo y un sinnúmero de pacientes pagaron con sus vidas el tratamiento al que se habían sometido.

Para tratar la locura, médicos como Herófilo utilizaban el eléboro blanco o negro, un temible vomitivo violento, que a veces curaba y otras, mataba. Su uso estaba fundamentado en la idea de "expeler" lo "tóxico", a través de la provocación de vómitos y purgas (Rossi, 2011).

Debe aceptarse que siglos atrás, antes de la revolución científica, se omitían aspectos importantes, como efectos secundarios tanto inmediatos como mediatos y solo se

atendía a un resultado visible beneficioso, statim, si es que era logrado. Claro está que tampoco se avocaban a medir el efecto placebo, susceptibilidad individual u otras circunstancias contemporáneas al tratamiento. El conocimiento científico actual debe considerar la evaluación terapéutica de un compuesto candidato a medicamento en forma **integral**.

Algunas especies vegetales pasaron la prueba de eficacia, evaluación farmacocinética, posología, así como la interacción con otros medicamentos, como lo fueron los activos del opio, en la era científica; cuyos **distintos componentes promisorios** se aislaron, purificaron y sometieron a una enorme batería de estudios, **no solo eficacia sino también seguridad**. A efectos de considerar a una sustancia en su estatus como medicamento debe evaluarse la vía de administración, la dosis, los intervalos de aplicación, la duración del tratamiento, así como los efectos secundarios y la toxicidad aguda y crónica.

Todos ellos han sido muy investigados y el consenso científico universal estableció oportunamente el manejo integral de estas sustancias para diversas enfermedades. Resulta interesante la lectura que ofrecen algunos autores destacados respecto a la historia del uso y abuso del Cannabis (Li, 1974; Escohotardo, 2005; Ben Amar, 2006; Rossi, 2011, Umit Sayin, 2014).

Hoy día, el florecimiento de páginas web dedicadas al Cannabis, permite la introducción de opiniones y/o aseveraciones que muchas veces son subjetivas, anecdóticas e incorrectas (desde la visión científica) o extemporáneas y lanzadas al público en general carente de una visión rigurosa, científica y metodológica, como para confrontar la información emitida. Por ello se origina así, una gran incertidumbre y confusión respecto a la verdadera eficacia versus los riesgos del cannabis aplicado en diversas enfermedades.

4. Últimos avances científicos en la aplicación del cannabis y/o sus componentes al

tratamiento de enfermedades y dolencias

4a. Epilepsias refractarias

La American Epilepsy Society (AES, 2016) entiende que el cannabis se aprobó para uso médico por opinión de los habitantes en varios Estados de los EEUU. Argumenta su oposición al uso expandido de la marihuana y sus derivados, en nombre de los 3.800 miembros de la sociedad, inclusive para el CBD (cannabidiol), utilizado en el tratamiento de niños con epilepsia severa, por falta de evidencia con ensayos controlados y las muy pocas investigaciones efectuadas hasta hoy. Surge entonces abordar lo evaluado por la ciencia, especialmente en los aspectos de seguridad y eficacia, prueba fundamental a la que cualquier medicamento en investigación debe ser sometido.

Otro punto importante a responder es si la modificación en la legislación debe preceder a los resultados de investigaciones científicas aún no concluidas ni consen-

suadas.

Existen ciertos reparos u objeciones de los investigadores del cannabis para uso medicinal. Entre los diversos inconvenientes se mencionan:

1. La dificultad de lograr cannabinoides puros y el altísimo costo que demanda obtenerlos en ese estado; requerimiento indispensable para ser aplicado como fármaco (AES, 2016)
2. Muy pocos estudios representativos, con resultados dispares en cuanto a la eficacia y la comprobación médica mediante indicadores fehacientes y consensuados, como el electroencefalograma (EEG) en epilepsias refractarias, que es el indicador por excelencia (Press et al, 2015).
3. Desconocimiento de efectos secundarios que no garantizarían el éxito total en el tratamiento de ciertas dolencias, como la epilepsia refractaria, con posible aparición de cuadros más graves que los de partida, previo a su administración (Devinsky et al 2015). O bien en los casos de HIV avanzados, el deterioro cognitivo agravado que han observado algunos investigadores (Volkow et al, 2014).
4. Escasos estudios lo suficientemente representativos, con uso de controles y evaluación del efecto placebo (Devinsky et al, 2015; AES, 2016).
5. Desconocimiento de las consecuencias de su consumo a largo plazo, en los pacientes tratados (Estudios Crónicos), especialmente en niños y adolescentes (Crean et al, 2011).

Hemos notado que los aspectos controvertidos señalados hace unos diez años, respecto de los efectos negativos del Cannabis, han sido bastante aclarados; o dicho de otro modo, hoy existe mayor consenso internacional respecto de los riesgos y daños potenciales del uso de Cannabis recreativo o medicinal, especialmente en adolescentes y adultos jóvenes respecto de de los informados hace dos décadas atrás.

La **AES** (American Epilepsy Society) dirigió una carta a un parlamentario estadounidense que propuso liberar el Cannabis en el Estado de Pensilvania con fines terapéuticos, especialmente en su faz antiepiléptica. La misiva está fechada 11 de marzo de 2016 y rubricada por su Presidente, Michael Privitera, MD, quien es además Director del Centro de Epilepsia del Instituto de Neurociencias de la Universidad de Cincinnati (AES, 2016). Hemos resaltado en negrita lo que entendemos reviste importancia en el contexto de este manuscrito. En cursiva, algunas aclaraciones de los autores de esta revisión.

En partes de la carta se menciona: El gran número de casos resistentes al tratamiento y la urgencia de nuevos tratamientos para la epilepsia, **pero se exige que estos tratamientos prueben su seguridad y eficacia** para ser verdaderamente útil a las personas con esta enfermedad.

A pesar de la presión frecuente de la evidencia anecdótica en la prensa popular y los medios de comunicación social, en los últimos dos años, la American Epilepsy Society se ha opuesto a la expansión del uso de la marihuana medicinal y su derivado, el cannabidiol o CBD, en

el tratamiento de los niños con epilepsia severa. **En este momento no hay pruebas de ensayos controlados que apoyen firmemente el uso de la marihuana para el tratamiento de la epilepsia.** La posición está basada en la falta de investigación disponible y apoyada por las declaraciones de la Academia Americana de Neurología, la Academia Americana de Pediatría y la Asociación Médica de Estados Unidos de América.

La Sociedad Americana de Epilepsia ha aconsejado continuamente a los Estados contra la sola evidencia anecdótica y ha pedido más investigaciones. La necesidad de más investigaciones es un tema constante de casi toda sociedad médica en los EE.UU.

Con el objeto de avanzar en la investigación, la AES ha solicitado a la Agencia Federal de Control de Drogas rever su postura ante la marihuana para facilitar el acceso a los estudios clínicos. Los legisladores bien intencionados que han promulgado leyes en muchos estados lo han hecho sin el beneficio de la evidencia científica, en este caso para enfermos epilépticos. Esto ha creado una situación incómoda donde **las leyes están por delante de la ciencia**, porque "no entendemos cómo y por qué funcionan los diversos tratamientos para los que son eficaces". La investigación también nos ayudará a comprender la dosis correcta, los efectos secundarios y posibles interacciones con otros medicamentos.

(Debemos recordar que el Cannabis posee muchas estructuras relacionadas al core benzopirano, especialmente CBD, THC y CBN, además de muchos otros, siendo el THC y su isómero delta 9 el único considerado de efecto psicoactivo)

En la actualidad, los expertos en epilepsia no han informado sobre un tratamiento seguro y eficaz empleando marihuana, tampoco los efectos a largo plazo sobre el aprendizaje, la memoria y el comportamiento, especialmente en lactantes y niños pequeños.

AES ha apoyado el programa de uso compasivo de la Compañía Farmacéutica GW Pharmaceuticals, donde una preparación **purificada y uniforme de cannabidiol (CBD) llamada Epidiolex®** está siendo administrado bajo la supervisión cuidadosa de un profesional médico apropiado. En diciembre del 2015, el investigador principal de este ensayo clínico, miembro de AES, Dr. Orrin Devinsky, publicó los resultados de un estudio de fase II y los presentó en la Asamblea anual de 2015 de la Sociedad Americana de Epilepsia, celebrada en Filadelfia. Mientras que el Dr. Devinsky calificó los hallazgos como prometedores, advirtió que **"estos resultados corresponden a un estudio no controlado. Se necesitan estudios adicionales para confirmar esos resultados.** Los estudios controlados aleatorios están en marcha lo cual permitirá comprender en profundidad la eficacia de la droga. Los resultados de este estudio de fase II acaban de publicarse en Lancet Neurology edición de marzo, 2016. La Fase III de este estudio está empezando siendo este un estudio controlado con placebo. AES es complaciente con este paso crítico para ayudar a toda nuestra comunidad a entender mejor el papel potencial del CBD en

el tratamiento de la epilepsia. También es importante observar que en estos estudios, el Epidiolex, se agregó a los regímenes de tratamiento farmacológico anti-epiléptico (AED) (es decir que reciben al mismo tiempo el Epidiolex y otros AED).

Resulta importante recalcar que el aceite Epidiolex (99% de CBD) utilizado en los ensayos clínicos es una sustancia **muy diferente de los productos del cannabis artesanal que están siendo considerados para su uso en Pennsylvania**, y se están utilizando en otros estados como Colorado. **En estados como Colorado, donde la marihuana medicinal y sus derivados son legales el contenido de estos productos no está regulado por la pureza o la uniformidad.** Productos de alto grado de pureza como Epidiolex han seguido procesos de Good Manufacturing, lo que significa que el contenido de CBD se mide por los estándares más rigurosos **siendo vigilado cuidadosamente respecto a la ausencia de aditivos o contaminantes. Nada de esto es cierto para los productos artesanales.**

(el Epidiolex es un aceite 99% de CBD, es decir altamente purificado y valorado con patrones o estándares; producido por la Compañía Farmacéutica GW Pharmaceuticals, para ser aplicado en casos de estudios compasivos. El aceite de Cannabis rico en CBD son aceites obtenidos artesanalmente mediante procesos de extracción y purificación casera cuya pureza está muy lejos de la obtenida por métodos avanzados en la Industria farmacéutica).

Los productos artesanales (se refiere a aquellos aceites obtenidos mediante extracción casera o elemental de las hojas e inflorescencias femeninas de diversas variedades) corrientemente provistos en Colorado no cumplen con la definición de la FDA de medicamento de uso compasivo

Para el tratamiento de la epilepsia la variedad Charlotte contiene una proporción apreciable de CBD, aunque impurificada por otros cannabinoides y posibles contaminantes (pesticidas, metales pesados, etc) difíciles de analizar como trazas.

Prosigue la carta: **La FDA requiere que los tratamientos de uso compasivo tengan los mismos criterios que los que un nuevo fármaco en investigación requiere, como pureza estándar, contenido uniforme** y la adhesión a los buenos procesos de fabricación. Como señalamos más arriba, ninguno de estos criterios aplican a los productos que utilizan aceite artesanal en las personas con epilepsia en el Estado de Colorado y estamos viendo resultados inquietantes que se indican a continuación. Sin embargo, estos y otros productos similares están siendo considerados para su uso en varios estados.

Un estudio de observación realizado en el Hospital de Niños de Colorado y publicado en la edición de abril

2015 de la revista *Epilepsia y Comportamiento*, **encontró que los aceites artesanales “altos CBD” no dieron como resultado una reducción significativa en los ataques de epilepsia en la mayoría de los pacientes. En aquellos para quienes los padres informaron mejoras, esas mejoras no se asociaron con una mejoría en los electroencefalogramas (EEG), la prueba de oro estándar de seguimiento para las personas con epilepsia.** (Se refiere al trabajo de Press et al, 2015 publicado en la Revista *Epilepsy and Behaviour*). Estos resultados fueron presentados por los profesionales del Hospital de Niños de Colorado quienes son miembros de AES y han evaluado un importante número de casos de niños con epilepsia tratados con el cannabis en los EE.UU. **Por otro lado, en el 13% de los casos examinados las convulsiones empeoraron con el uso del aceite** presentando, en algunos pacientes eventos adversos significativos. Estas no son las historias escuchadas en audiencias públicas o leídas en la prensa popular. **A diferencia del producto utilizado en el estudio compasivo realizado por el laboratorio farmacéutico GW Pharmaceutical, las familias y los niños que se desplazan a Colorado están recibiendo preparaciones artesanales no reguladas, muy variables, de aceite de Cannabis prescritas, en la mayoría de los casos, por médicos sin formación en pediatría, neurología o en epilepsia.** Como resultado de ello, los especialistas en epilepsia en Colorado han atendido a los niños presentando graves reacciones distónicas y otros trastornos del movimiento, regresión en el desarrollo, vómitos intratables y convulsiones; empeoramiento que pueden ser tan graves que deben poner al niño en coma a efectos de detener dichas convulsiones. Debido a que estos productos no están regulados, es imposible saber si estas reacciones adversas peligrosas se deben al CBD (o bien, THC u otros cannabinoides) o contaminantes en estas preparaciones artesanales.

(En línea con este concepto, la AES, tiende a evitar que los contaminantes puedan interferir en la evaluación de los resultados clínicos y/o evitar episodios adversos o tóxicos debido a presencia de contaminantes ajeno a los componentes químicos propios del aceite de cannabis (como pesticidas y metales pesados).

Por otra parte “La nueva Ley de cannabis en el Estado de Israel” que comenzará a regir a partir del año 2017, hace hincapié en la calidad y pureza de los aceites; es decir, es mucho más exigente que la actualmente vigente, en ese sentido. Así, por ejemplo esa ley expresa:

El nuevo modelo considera al cannabis medicinal como una droga (como morfina, oxycodon y toda droga considerada peligrosa). No habrá, como hasta ahora, un número de productores limitados, sino que el que quiera recibir autorización para producir deberá hacerlo en condiciones de GAP (Good Agricultural Practice). Deberá presentar un certificado de control de calidad de un laboratorio autorizado aplicando normas ISO17025 que incluya: contenido de distintos componentes cannabinoides, examen microscópico para analizar presencia de insectos y estado de los tricomas de la planta, análisis de metales pesados (por el suelo), pesticidas (está prohibido usarlos) y bacteriológico (bacterias y hongos).

El equipo de Colorado también ha visto familias que han contraído una deuda importante, que pagan cientos de dólares al mes por los aceites que parecen no actuar en la gran mayoría.

Especialistas en epilepsia en Colorado están llevando a cabo un estudio observacional financiado por el estado con el objeto de vigilar a los niños tratados con CBD (Epidiolex). El estudio consistirá en el análisis de los resultados de 150 pacientes tratados con marihuana medicinal que consumen productos de Cannabis con regularidad. Este es sólo uno de los tantos estudios actualmente en curso con CBD para personas con epilepsia. Existe enorme interés dentro de la comunidad profesional de explorar el potencial del CBD, sin embargo, resulta necesario **realizar la investigación, antes que se promulguen nuevas leyes.**

Vale la pena señalar que en febrero de 2016 y febrero de 2015 la FDA emitió varias cartas de advertencia a las empresas con productos que contienen CBD (se refiere a los aceites artesanales). La FDA ha analizado estos productos y, en algunos de ellos, **no se detectó CBD** como se reivindica en la etiqueta. Debido a que no existe un estándar para estos productos, el mercado está inundado cada vez más de una amplia variedad de productos. The American Epilepsy Society no es insensible a la desesperación de los padres cuyos hijos tienen epilepsias graves resistentes al tratamiento

convencional. Nuestros miembros, enfrentan todos los días en la clínica y están muy en sintonía con estas familias en la necesidad del uso compasivo y de nuevas terapias prometedoras en circunstancias apropiadas y controladas. **Estamos sin embargo, opuestos a la utilización de preparados artesanales de compuestos no regulados de Cannabis con contenido no verificado y elaborados por personas que no tienen experiencia en la producción farmacéutica.** Eso es lo que está sucediendo actualmente en Colorado y otros estados de todo el condado, que legalizaron el uso de productos de marihuana medicinal. **En resumen, simplemente no hay investigación clínica, controlada para apoyar la adopción de una nueva legislación sobre el uso de CBD en el tratamiento de la epilepsia como su Estado** (se refiere al Legislador y el Estado de Pensilvania) **está considerando. Los resultados anecdóticos de unas pocas familias en Colorado, compartidos en los medios de comunicación, no deben ser la base para la elaboración de leyes.**

La fiebre de los Estados para aprobar la legislación sobre CBD ha creado una situación inusual en la cual las personas con epilepsia y sus familias están demandando el acceso a una sustancia de cosecha propia muy variables que puede o no ser beneficiosa y la comunidad médica y científica carece de los datos de eficacia y seguridad necesarias para tomar buenas decisiones de tratamiento con respecto al Cannabis para las personas con epilepsia, especialmente en los niños. También ha creado una carga financiera y administrativa importante para los estados” (AES, 2016).

4b. Cannabinoides utilizados en Oncología para mitigar los efectos secundarios de quimioterápicos

Recientemente, Kramer publicó una interesante revisión que incluye el racconto de las investigaciones publicadas con arbitraje previo (peer review) y otras no publicadas en sistema arbitral, respecto de la aplicación del Cannabis en forma de marihuana fumada y cannabinoides aislados de la planta en el tratamiento con adyuvantes post quimioterapia (Kramer, 2015).

Se acepta que el cannabis para uso en patologías oncológicas opera sobre 3 blancos de acción como eje: en el tratamiento de las náuseas, en la falta de apetito y sobre el dolor.

El trabajo menciona tres tipos de medicamentos que se encuentran en el mercado farmacéutico, a base de cannabinoides:

I. Nabilone (Cesamet®)

II. Dronabinol (Marinol®)

III. Nabiximols (Sativex®)

I. NABILONE:

Es un cannabinoide sintético, molecularmente semejante al THC: antiemético con propiedades analgésicas. Aunque fue aprobado por la FDA de EEUU en 1985, recién en 2006 comenzó a expandirse. Se utiliza para los casos de náuseas y vómitos en tratamiento con quimioterapia, que no responden a los fármacos utilizados frecuentemente. Sin embargo, la eficacia del Nabilone parece estar muy relacionada al tipo de agente quimioterápico utilizado en el tratamiento oncológico (Lynch & Campbell, 2011). Por otro lado, los efectos

II. DRONABINOL:

Es el mejor estudiado para uso en náuseas secundaria a quimioterapia. El mecanismo con el cual se considera que opera es por inhibición del centro del vómito en el Sistema Nervioso. El principio activo es el isómero trans THC disuelto en aceite de sésamo en capsula de gelatina.

Fue aprobado por la FDA en diciembre de 1992. También es usado en la anorexia; posee un efecto sostenido sobre el apetito de hasta 5 meses en pacientes con SIDA en dosis 2,5 a 20 mg/día. La dosis de 2,5 mg/día, aporta 10 veces menos que la concentración psicoactiva (5 ng/días). Presenta también efectos en el estado de ánimo. Solo el 10 al 20 por ciento alcanza la circulación sistémica. El efecto psicoactivo dura de 4 a 6 hs.

El uso crónico trae aparejado los siguientes efectos: taquicardia, irritación de conjuntivas. Efectos adversos: amnesia, cambios de humor, espejismo alucinación, depresión, ansiedad, palpitaciones cardíacas. Menos serios: ataxia, euforia, náusea, vómitos, problemas de pensamientos, mareos, somnolencia, astenia, visión borrosa, resecaamiento de boca, hipotensión ortostática, inquietud.

Especial cuidado debe ser tenido en cuenta en la interacción con alcohol debido a que se potencia el efecto depresor. Se encuentra contraindicado en pacientes con alta sensibilidad a cannabinoides, pacientes con riesgo cardíaco, puede causar hipotensión y debe vigilarse en pacien-

tes con hipertensión. El alcoholismo constituye un riesgo con el abuso del dronabinol. También podría exacerbar las condiciones de esquizofrenia o psicosis.

secundarios también son quimio-dependientes y en función de la co-medicación administrada (Kramer, 2015).

III. NABIXIMOLS:

Es un extracto natural de la planta que contiene THC/CBD (1.08: 1.00). Se utiliza como espray para mucosa. Es administrado para el tratamiento del dolor además de antiemético. Las concentraciones de uso son 10 veces menores en THC respecto a la concentración considerada psicoactiva (5 ng por ml sangre) (Indorato et al, 2016). Aprobado en Canadá y parte de Europa para tratamiento de espasticidad en esclerosis múltiple, es también investigada en clínica en EEUU para tratamiento del dolor.

El Nabiximols (SATIVEX®) espray oral, para tratamiento de dolor y esclerosis, fue aprobado en Canadá. No presenta efecto psicoactivo como la marihuana fumada, por las muy bajas concentraciones en que es utilizado, por ello se estima no puede ser usado como narcótico.

OTRA INVESTIGACIONES PUBLICADAS:

Kramer menciona dos publicaciones de Chang de los años 1979 y 1981. En la primera, nota mejorías en 14/15 pacientes tratados con metotrexato; en la segunda, 8 pacientes tratados con doxorubicina y ciclofosfamida, no mostraron mejoras en ningún caso. En ambos ensayos con placebo, se utilizó marihuana fumada con agregado de THC. Los efectos antieméticos correlacionaron con altos niveles de THC.

El autor también menciona otros estudios pero que no han sido publicados en revistas arbitradas. Sin embargo, observamos resultados dispares en cuanto a la eficacia para este tipo de tratamiento. Es evidente que el conocimiento en este campo aún requiere mayor investigación.

4c. Uso en esclerosis múltiple (EM) o espasticidad.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante, neurodegenerativa del sistema nervioso central. Se acepta que posee rasgos de una enfermedad autoinmune, aunque el mecanismo exacto se desconoce hasta hoy. A consecuencia de ello, las neuronas del cerebro pierden parcial o totalmente su capacidad de transmisión, causando los síntomas típicos de adormecimiento, cosquilleo, espasmos, parálisis, fatiga y alteraciones en la vista.

Lakhan & Rowlands (2009) revisaron sistemáticamente seis estudios referidos a la dosificación y duración del tratamiento, las medidas objetivas y subjetivas de espasticidad así como los informes de eventos adversos informados. Aunque hubo variaciones en los resultados presentados en estos estudios, se observó una tendencia a la reducción de la espasticidad en los pacientes tratados. Se informaron eventos adversos en cada estudio. Los extractos combinados de TCH y el CBD se consideraron generalmente bien tolerados por lo que los autores encuentran evidencia que la combinación de extractos de THC y CBD puede proporcionar un beneficio terapéutico en los síntomas de espasticidad en EM. Aunque algunas medidas objetivas de la espasticidad denotan tendencia a la mejora, no hubo cambios que se consideren significativos en las evaluaciones

posteriores al tratamiento. Sin embargo, la evaluación subjetiva de alivio de los síntomas muestra a menudo significativa mejoría después del tratamiento.

No obstante, un reciente estudio efectuado en veinte pacientes con EM que fumaban Cannabis para aliviar los síntomas versus 19 pacientes con EM que no fumaban Cannabis. (Romero et al, 2015) sugiere que el consumo de Cannabis en EM resultó en déficits cognitivo más extendido, que se correlacionan con el volumen de tejido en las regiones subcortical, temporal medial, y prefrontales. Las imágenes por resonancia magnética fueron segmentadas en la materia gris y materia blanca, y posteriormente analizadas por cuadrados mínimos parciales, una técnica multivariante basada en datos que exploran asociaciones cerebro-conductuales. Estos son los primeros resultados que demuestran una asociación entre el consumo de cannabis, el deterioro cognitivo y los cambios estructurales del cerebro en pacientes con EM.

Por otro lado, investigadores de Canadá y EEUU (Iskedjian et al, 2007) concluyen que preparados farmacéuticos tales como Sativex® (Nabiximols), espray bucal, resulta efectivo en el tratamiento del dolor por EM, aunque aclaran que suponen que el dolor estaría relacionado con la EM y lo asimilan al dolor neuropático. Asimismo, advierten el bajo número de publicaciones y pacientes, incluidos en este meta-análisis.

Podemos razonablemente concluir que en esta patología los resultados no son concluyentes, observándose, tal como en las otras ya descritas, el riesgo del efecto adverso cognitivo, entre otros destacados.

4.d Glaucoma

El glaucoma es una afección ocular en la cual el nervio óptico se va dañando con el paso del tiempo, reduciendo la visión lateral. En ocasiones, esta afección termina ocasionando la ceguera. Una causa del daño del nervio óptico producido por el glaucoma es una presión superior a la normal en el interior del ojo llamada presión intraocular (PIO).

Investigaciones informadas por la American Academic of Ophthalmology (American Acad Ophtal, update, 2014) indicaron que cuando se fuma marihuana o cuando se toma su ingrediente activo, ya sea en forma de píldora o mediante una inyección, en efecto baja el nivel de la PIO. Sin embargo, la PIO sólo disminuye por un breve período de tiempo (alrededor de tres o cuatro horas) siendo ello una importante desventaja en el uso de la marihuana como tratamiento para el glaucoma debido a que el glaucoma necesita estar controlado las 24 horas del día. El paciente tendría que fumar marihuana seis a ocho veces al día, todos los días, para mantener un nivel reducido de la PIO en forma constante.

Estudios recientemente indican que la disminución del flujo de sangre al nervio óptico también puede causar daños en pacientes con glaucoma. La marihuana no sólo reduce la PIO, también reduce la presión sanguínea en todo el cuerpo. Por ello, es posible que también reduzca el flujo de sangre que llega al nervio óptico, contrarrestando el beneficio de una PIO reducida.

Por ello, la American Academic of Ophthalmology indica que la marihuana si bien puede disminuir temporalmente la

PIO, no está recomendada para tratar el glaucoma

5. Fundamentos de los Proyectos de Ley sobre cannabis medicinal para ser debatidos en la HCD de la Nación

Si observamos el fundamento de varios proyectos de Ley enviados al Congreso Nacional Argentino (hasta junio de 2016), accedido a través de la Red Argentina de Toxicología (Redartox, 2016), se notará inmediatamente que muchos de los conceptos vertidos en ellos se contraponen a lo consignado más arriba por los expertos e investigadores del Cannabis para uso medicinal. En esos proyectos se hace alusión a los aceites artesanales de Cannabis y no a los principios activos purificados, separados de innumerables componentes contenidos en el aceite artesanal.

En cuanto a las otras patologías reseñadas, el informe autorizado por el Instituto de Medicina, si bien reconoce algunos beneficios potenciales de la marihuana, en estimular el apetito, en particular en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y el síndrome de desgaste relacionado a esta enfermedad, y en el combate contra las náuseas y vómitos debidos a quimioterapia inducida, dolor severo, y algunas formas de espasticidad, destaca los efectos adversos que enfrentan los pacientes sin aun haberse comprendido el alcance y magnitud, como para evaluar la ecuación riesgo-beneficio. Una contribución hace hincapié en la importancia de centrar los esfuerzos de investigación **en el potencial terapéutico de cannabinoides sintéticos o en estado puro farmacéuticamente** (Volkow et al 2014).

Aún, con ese objetivo, tampoco hasta hoy se han generado posibles candidatos a medicamentos, a excepción de algunas modificaciones de los benzopiranos del cannabis natural. La gran mayoría de los cientos de estructuras químicas cannabimiméticas ensayadas por la industria farmacéutica fueron desechadas por su toxicidad y potencial adictivo, mucho más elevado que el mismo THC (Ferrari, 2016).

Esta práctica aumenta la preocupación sobre los problemas particulares en relación con el uso a largo plazo por parte de poblaciones vulnerables. Por ejemplo, hay algunas evidencias que en pacientes con síntomas del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o SIDA, el consumo de marihuana en realidad puede agravar el déficit cognitivo asociado al VIH (Cristiani et al, 2004).

Es necesario realizar investigaciones sobre las formas en que las políticas gubernamentales sobre la marihuana afectarían a la salud pública. Históricamente, ha habido una correlación inversa entre uso de la marihuana y la percepción de sus riesgos entre los adolescentes. Suponiendo que esta relación inversa es causal, ¿Habría una mayor permisividad cultural y de política social llevando a un aumento en el número de personas jóvenes que están expuestas al cannabis en forma regular? (Volkow et al, 2014).

A este respecto Nora Volkow, Directora del NIDA-NIH de EEUU ha expresado: "Se ha manipulado la información sobre los efectos de la marihuana y eso provocó un cambio de actitud. El público en general está aceptando que es beneficiosa. Y eso es un error". El 9% de los expuestos a la marihuana se vuelven adictos y en un mayor porcentaje los adolescentes. "Los indicadores del estado de Colorado no son positivos. Presentan un aumento del 15% de consumi-

dores que el resto de los estados”.

Uno de los puntos que colocó a Colorado como un territorio amistoso para el uso recreacional de la marihuana fue la fijación de la idea que la droga ayuda a soportar

tratamientos médicos invasivos. En opinión de la especialista norteamericana, para sostener esa teoría, fueron usados estudios no confirmados científicamente. “La marihuana afecta el cerebro... Tiene algunos componentes que potencialmente pueden contar con capacidades terapéuticas, pero no es un medicamento”

“En el estado de Colorado la legalización del uso médico de marihuana empezó en los años 90 y tomó fuerza en la última década. Sin embargo, la mayor parte de los individuos que consiguen la receta son jóvenes entre 20 y 30 años, por lo que parece una forma de facilitar el acceso a la droga” (Cfr. Nora Volkow - entrevista al periódico La Nación de Argentina en 2014.)

Además, la UNODC en 2015 advirtió respecto del Estado de Colorado, que solo aporta poco más de la mitad de Cannabis de la demanda. Por ejemplo, las personas que consumieron durante 2014 fueron 690.000. La cantidad necesaria para abastecer se calcula en 110-130 Toneladas, pero la cantidad ofertada por el Estado en ese año fue aproximadamente 77 Toneladas. Es decir, la cantidad faltante fue más de 55 Ton; por lo que dicho faltante fue abastecido por cultivos personales o fuentes no lícitas o mercado negro (UNODC, 2015).

Lo que entendemos no es viable, ni siquiera so pretexto compasivo, de preparaciones artesanales, impuras y sin valoración cuali-cuantitativa de impurezas, dado que se estaría exponiendo a los pacientes, especialmente niños y adolescentes, a efectos que ni siquiera han sido evaluados y con consecuencia neurocognitivas impredecibles, atento lo que fue expuesto ut supra.

Esto último se encuentra en línea con el criterio del Estado de Israel que ha modificado el régimen actual del cultivo y comercialización de Cannabis con fines medicinales, siendo mucho más estricto en el control de principios activos; inclusive, con evaluación de pesticidas y metales pesados procedentes del suelo o bien de los productos que deben ser agregados a las plantaciones de cannabis como pesticidas. Exige que los Laboratorios controles se encuentren acreditados por Normas ISO 17025; además de las plantaciones cumplir con las GAP (buenas prácticas de agricultura); ello denotando una exigencia de elevadísimo nivel para evitar aceites o extractos contaminados o impuros. Esta nueva Ley Israelí entrará en vigencia en abril de 2017.

Entendemos que el problema es complejo. Los resultados en niños y padres de familia que testimonian el mejoramiento significativo de enfermedades no puede ser ignorado, pero al mismo tiempo debe pesarse los riesgos que entrañaría el uso masivo de Cannabis sin haber aún la ciencia comprendido como actúan los componentes de la planta, su eficacia con estudios placebo efectuados a un número relevante de casos, los efectos a largo plazo a los que estarán expuestos aquellos enfermos y que hoy prácticamente se

desconocen; el enorme andamiaje tecnológico-científico que deberá aplicarse para perfeccionar investigaciones serias. Los agentes gubernamentales de control que eviten un desvío al uso ilícito, que devendría en consecuencias legales (conducción bajo los efectos de la droga, efectos psicóticos que generarían conductas negativas de consecuencias penales, laborales y familiares).

Creemos con este escrito, aportar nuestra visión para ser incluida dentro de la discusión que surja oportunamente.

Conclusión:

Es nuestra opinión, en base a lo expuesto precedentemente, que:

1. El Cannabis se encuentra en una etapa inicial de estudio farmacológico, no cumpliendo al día de hoy las condiciones que se requieren, como para cualquier otro medicamento, en la aplicación masiva en terapias de diversas dolencias o patologías.
2. En algunas enfermedades, como epilepsia refractarias, aún se necesitan estudios más profundos que permitan valorar fehacientemente su eficacia y efectos secundarios con el objeto de discernir el riesgo/beneficio del esquema terapéutico. En estos casos el efecto placebo suele ser relevante. Sin embargo los últimos estudios realizados en pacientes refractarios se efectuaron sin placebo.
3. Los preparados artesanales, basados en la extracción de variedades de Cannabis con alta concentración de cannabidiol (CBD), ofrecen riesgos que aún la ciencia no puede medir ni predecir. No obstante, terapias de tipo compasivo utilizan, en los Estados Unidos, un CBD de pureza mayor al 99%, purificado en la Industria farmacéutica y que conlleva un alto costo de obtención.
4. La implementación de un Plan de investigación y de aplicación de uso compasivo podría plantearse, a la luz de la norma que regía en Argentina en el año 1968, mediante la Ley 17.818 que contempla “cantidades estrictamente necesarias para la investigación médica y científica, incluidos los experimentos clínicos con estupefacientes que se realicen bajo vigilancia y fiscalización de la autoridad sanitaria” descartándose palmariamente la liberación fuera de estos fines restringidos hacia un nuevo medicamento.
5. Tal como sucedió con los principios activos del opio (*Papaver somniferum*), entendemos que es posible estudiar aquellos componentes del cannabis que presenten mayores chances de aplicación terapéutica, tal como el CBD para tratar epilepsias refractarias, mediante un estudio integral, con controles, valoración de efecto placebo, toxicidad, estudios de efectos secundarios agudos y crónicos (muy especialmente la afectación neurocognitiva en niños y adolescentes) sin dejarlo librado al consumo discrecional, folclórico tal como el empleo del opio se encuentra fuera de uso recreacional y sus principios activos utilizados como fármacos.
6. Respecto del THC, psicoactivo, la situación es mucho más compleja que para el CBD. El deterioro neurocognitivo, la afectación en la coordinación motora, la posible puerta de entrada a otras drogas, el riesgo de episodios psicóticos, la dificultad en dosificar u obtener puro el compuesto a través de variedades ricas en THC, la variabilidad de principio activo entre distintas cepas de Cannabis y la falta de información en los estudios de seguridad y deterioros crónicos observados en diversas patologías, constituyen, hoy día, un enorme desafío, que cuenta con muchos ribetes negativos

de consecuencias imprevisibles en las generaciones futuras. El encarar incursiones investigativas en este aspecto del cannabis impondría a las autoridades nacionales pergeñar un plan serio y viable y en situación de contralor estricto para evitar desvíos al uso recreativo; además, prevenir las inversiones que demandaría los estudios por parte del Estado y los protocolos éticos de investigación en caso que el Parlamento decidiera autorizar el uso de cannabis con fines médicos y/o de investigación.

7. Entendemos que la liberación del consumo recreativo de marihuana, constituye un enorme peligro para la salud y las conductas sociales, especialmente en adolescentes y adultos jóvenes. Por otro lado, esta población vulnerable, podría leer en esta liberación que el estado acepta no solo su inocuidad sino también sus “beneficios” terapéutico, propiciando de algún modo el acceso al consumo de marihuana, cuyas consecuencias negativas se constatan a medida que transcurren los años en aquellos países o Estados que han liberado su uso o cuyo uso ha sido más permisivo.

8. Si bien estamos de acuerdo que el prohibicionismo no ha traído hasta hoy una solución a la problemática del consumo ilícito, tampoco la liberación del consumo ha solucionado el tema, con indicadores agravantes en aquellos Estados que liberaron el Cannabis. Por ejemplo, Colorado no solo posee un mayor porcentaje de consumidores sino también un mercado negro ilegal o de autocultivo de especies difíciles de valorar en su principio activo, THC, para compensar la limitada falta de oferta del Estado.

9. Los autores de esta revisión y los científicos en general entienden la situación de muchos pacientes y familiares angustiados, en búsqueda de una solución a las enfermedades que padecen, pero la ciencia no puede desvirtuar su ítere por el método científico, ya que estaría exponiendo justamente a los afectados y sus familias a resultados que con el tiempo devendrían en decepcionantes o bien, creando otras patologías tan angustiantes como las que pretendieron remitir. No pueden tomarse casos aislados que resultaron beneficiosos como demostración de eficacia en un medicamento. Hay casos públicos en los que los pacientes o sus familiares afirman remisiones, pero otros (generalmente no llegan a la prensa o los medios de comunicación) en los que los resultados de la terapia por CBD, fueron más graves que los síntomas de partida (cfr. Devinsky et al, 2015; Press et al, 2015; AES, 2016;).

10. Creemos que es muy importante implementar un plan integral de educación y prevención de consumo de cannabis en adolescentes y adultos jóvenes haciendo hincapié en las consecuencias de la exposición a la sustancia, independientemente de su potencial como medicamento.

Referencias

American Epilepsy Society (AES). Letter to Representative Matthew Baker and Pennsylvania Legislature. March, 11 (2016).

American Academy of Ophthalmology. Complementary therapy assessment marijuana in the treatment of glaucoma. Update, pp 1-7 (2014)

Ammerman S, Ryan S and Adelman WP. The Impact of Marijuana Policies on Youth: Clinical, Research, and Legal Update. *Pediatrics* 135 (3), 1-17 (2015)

Asbridge M, Hayden JA & Cartwright JL. Acute cannabis consumption and motor vehicle collision risk: systematic review of observational studies and meta-analysis. *British Med J* 344, e536 (2012).

Ben Amar M. Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 1-25 (2006)

Bosson M. G., Jager, G., Bhattacharyya, S. & Allen, P. Acute and non-acute Effects of Cannabis on Human Memory Function: a Critical Review of Neuroimaging Studies. *Curr Pharm Des* 20, 2114-25 (2014).

Crean RD, Crane NA, Mason BJ. An evidence based review of acute and long term effects of cannabis use on executive cognitive functions. *J Addict. Med.* 51-8 (2011)

Cristiani SA, Pukay-Martin ND, Bornstein RA. Marijuana use and cognitive function in HIV infected people. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*; 16330-35 (2004)

Desrosiers, N. A., Ramaekers, J. G., Chauchard, E., Gorelick, D. A. & Huestis, M. A. Smoked cannabis' psychomotor and neurocognitive effects in occasional and frequent smokers. *J Anal Toxicol* 39, 251-61 (2015).

Devinsky, O., Eric Marsh, Daniel Friedman, Elizabeth Thiele, Linda Laux, Joseph Sullivan, Ian Miller, Robert Flamini, Angus Wilfong, Francis Filloux, Matthew Wong, Nicole Tilton, Patricia Bruno, Judith Bluvstein, Julie Hedlund, Rebecca Kamens, Jane Maclean, Srishti Nangia, Nilika Shah Singhal, Carey A Wilson, Anup Patel, Maria Roberta Cilio. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. *The Lancet Neurology*, (2015)

ElSohly MA. Potency Monitoring Program quarterly Rep. N° 123 — Rep. period: 09/16/ 2013- 12 / 15/ 2013. Oxford: Univ. Of Mississippi, Nat. Center for Natural Products Research, (2014)

Escototado, A. Historia General de las Drogas. Ed. España, (2005).

Ferrari LA. Nuevas drogas de diseño psicoactivas (NPS): estado actual del conocimiento. *Rev. Ciencia e Investigación* 66, 33-54 (2016).

Hall, W. & Degenhardt, L. Adverse health effects of non-medical cannabis use. *Lancet* 374, 1383-91 (2009).

Hall, W. What has research over the past two decades revealed about the adverse health effects of recreational cannabis use? *Addiction* 110, 19-35 (2015).

Hartman, RL & Huestis, MA. Cannabis effects on driving skills. *Clin Chem* 59, 478-92 (2013).

Indorato F, Liberto I, Ledda C, Romano G, Barbera N. The therapeutic use of cannabinoids: Forensic aspects. *Forensic Sci. Int.* 265: 200-203 (2016)

Iskedjian M, Bereza B, Gordon A, Piwko C and Einarson T. Meta-analysis of cannabis based treatments for neuropathic and multiple sclerosis-related pain. *Current Medical Res. and Opinion* 23, 17-24 (2007)

Kendell, R. cannabis condemned: The proscription of Indian hemp *Addiction* 98, 143-151(2003)

Kramer JL. Medical Marijuana for Cancer. *Cancer J. Clin* 65 (2) 109 -122 (2015).

Lakhan S and Rowlands M. Whole plant cannabis extracts in the treatment of spasticity in Multiple sclerosis: a systematic review. *BMC Neurology*, 9:59 (2009)

Li HL. An Archaeological and Historical Account of Cannabis in China. *Economic Botany* 28: 437-448. (1974)

Lynch M & Campbell F. Cannabinoids for treatment of chronic non-cancer pain; a systematic review of randomized trials. *Br J Clin Pharmacol.* 72(5): 735-744. (2011)

McGrath, Welham J, Scott J, Vargas D, L Degenhardt y Hayatbakhsh MR et al., Association between cannabis use and psychosis-related outcomes by sibling pair analysis in a cohort of young adults. *Arch Gen Psychiatry* 67 (2010).

Miech, R. A., Johnston, L. D., O'Malley, P. M., Bachman, J. G. & Schulenberg, J. E. (NIDA- 2014). Monitoring the future. National survey results on drug use 1975-2014 (2014).

Press CA, Knupp KG and Chapman KE. Parental reporting of response to oral cannabis extracts for treatment of refractory epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 45, 49-52 (2015)

Ramaekers, J. G. et al. Cannabis and tolerance: acute drug impairment as a function of cannabis use history. *Sci. Rep.* 6, 26843, (2016).

REDARTOX (Red Argentina de Toxicología) Proyecto de Ley: cannabis para uso medicinal – publicado el 16 Junio de 2016. (2016)

Romero K, Pavisian B, Staines W and Feinstein A. Multiple sclerosis, cannabis, and cognition: A structural MRI study. *Neuroimage Clin.* 8: 140-147 (2015)

Rossi, L. Historia de las drogas y sus usos. J de Práct Polít e Inst Honorable Senado de la Nación, http://intersecciones.psiuba.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=57/historia-de-las-drogas-y-sus-usos&catid=10/vigencia&Itemid=1. Secretaría de Extensión, Facultad de Psicología, UBA (2011)

Shapiro GK & Buckley Hunter L. What every adolescent needs to know: Cannabis can cause psychosis. *Journal of Psychosomatic Research* 69, 533-539 (2010)

Umit Sayin, H. The Consumption of Psychoactive Plants during Religious Rituals: The Roots of Common Symbols and Figures in Religions and Myths. *NeuroQuantology*, Volume 12 (2) 276-296 (2014)

UNODC, Informe Anual (2015)

Volkow, ND, RD Baler, WM Compton y SRB Weiss. Adverse Health Effects of Marijuana Use. *The New England Jof Medicine*, 370, 2219-2227 (2014).

Wong K, Brady JE and Li G. Establishing legal limits for driving under the influence of marijuana. *Injury Epidemiology* 1:26, 1-8 (2014)

Glosario

Cannabis sativa: nombre botánico de la planta de cáñamo a partir del cual se obtiene el cannabis Marijuana. Un sinónimo de cannabis que también se refiere a las flores y hojas secas de la planta.

Cannabinoides: compuestos derivados de plantas y endógenos o análogos sintéticos

Delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ9-THC): Principal cannabinoide de origen vegetal psicoactivo; la cantidad relativa de Δ9-THC en una preparación determina la intensidad de los efectos psicológicos

Cannabidiol (CBD): el principal cannabinoide no-psicoactivo derivado de la planta.

Cannabinol (CBN): Cannabinol. Compuesto de estructura química similar al THC pero sin actividad psíquica

Endocannabinoides: moléculas endógenas de lípidos involucrados en la señalización que se encuentran en todo el cuerpo

Extracto de cannabis Oral: Extractos tales como Cannador, capsulas con definida relación THC: CBD (2.50:1.25 mg)

Dronabinol (Marinol): sintético Δ9-THC de consumo en forma oral

Nabilone (Cesamet): cannabinoide sintético de consumo oral similar al Δ9-THC

Nabiximols (Sativex): spray de hierba oromucosal con definida relación THC: CBD (2.7:2.5 mg)

Terapias de uso compasivo: permiten que los pacientes reciban terapias que son prometedoras contra alguna afección, pero que aún no se han estudiado plenamente o han sido aprobadas; cuando no hay otra opción de tratamiento.

PHARMACOKINETICS AND POSTMORTEM TOXICOLOGY: ISSUES AND CAVEATS FOR INTERPRETATION

W. Lee Hearn, PhD, Forensic Toxicologist

Forensic toxicologists face a unique challenge when called to interpret the quantitative results obtained from analysis of postmortem specimens. In the living body, the drug concentrations in blood are determined from the dose, the person's gender, state of health and body weight and with the specific chemical characteristics of the drug. The specialty in pharmacology that studies the relation between the body and the drug over time is called pharmacokinetics.

When a drug is ingested, it is absorbed into the bloodstream, and then it is carried through the body where it interacts with and distributes into all tissues of the body. At the same time, the body is acting on the drug, modifying it by metabolism and excreting it. The concentration in the blood rises as the drug absorbs and reaches a plateau when the rate of absorption equals the rate of elimination. Then it decreases until it is gone from the body. The pharmacokinetic properties of the drug determine the concentration in the blood at any given time after it is ingested, up to the time that it is completely eliminated, or to the time of death. In an overdose, death may occur while the drug is absorbing and distributing, or as the drug concentration is declining, and we probably will not know what was happening when the person died. When someone dies, the body begins to change immediately, and the changes continue through the time of autopsy. The "blood" samples submitted for toxicology analysis are different from blood collected from a living person, and the postmortem changes affect the concentrations of drugs that they contain. If we are not aware of the way that drug concentrations change, we may make errors in interpreting the role that the measured drugs had in the person's death. Two key objectives of this presentation are to stress that pharmacokinetic calculations must not be applied to postmortem drug concentrations and that postmortem drug concentrations should not be compared to concentrations obtained in clinical studies of living people for interpretation of the drug's role in causing death.

The two known factors that affect the drug concentrations in postmortem blood are incomplete distribution and postmortem redistribution.

Incomplete drug distribution

Potentially, concentrations of any drug can be affected by incomplete distribution, and any route of administration may be affected. If a person dies after consuming a drug, but before the drug is completely absorbed and distributed in the body, a higher concentration of drug will remain at the site of absorption. After death, the drug will diffuse into surrounding tissues, including blood in the arteries, veins and capillaries, and blood samples collected from those areas at autopsy will have a higher drug concentration than blood in distant parts of the body.

Drugs unabsorbed from the stomach and small intestine may diffuse into the vena cava, heart and aorta, increasing concentrations in the blood in those vessels, which is commonly called central blood. Drugs inhaled and deposited into the lungs will diffuse into the central blood after death. In addition, it is common for people to vomit as they die, and to aspirate stomach contents into the lungs. If the inhaled stomach contents have a high concentration of drug, that drug can also enter the central blood from the lungs. Injected drugs are carried toward the heart, and when death occurs rapidly, circulation stops and a high concentration of drug may remain in the central blood and proximal to the injection site.

Less common routes of administration, such as rectal and transdermal may produce elevated drug concentrations in blood at more distant locations in the body, such as the femoral and iliac veins in the legs and lower abdomen or the subclavian veins in the upper chest. Blood samples collected from those veins are considered to be peripheral blood because it was moving from the legs or arms toward the heart when death occurred.

Postmortem drug redistribution

Before the 1990s it was widely believed that drug concentrations in blood did not change after death. Interpretation of drug concentrations in postmortem blood was based upon reference tables of therapeutic, toxic and lethal drug concentrations compiled from clinical pharmacology and postmortem toxicology publications. If the case had one or more drugs at concentrations above the therapeutic and toxic ranges, the interpretation was that the reported drug or drugs caused death.

In the late 1980's the interpretation began to change when forensic toxicologists reported that many weakly basic drugs were present in central blood at higher concentrations than in peripheral blood. At a meeting of TIAFT in Banff, Canada in 1987, Prouty and Anderson from the US and Jones and Pounder from Canada reported results of their comparison of drug concentrations in blood from the heart and femoral veins of decedents and concluded that the observed differences were evidence that some drugs redistribute from solid tissues to blood in nearby blood vessels after death. They called the phenomenon postmortem redistribution (PMR) and suggested that the ratio of drug concentrations in heart blood and femoral vein blood (HB/FB) could indicate whether PMR occurs with a specific drug.

Since that time, many studies have been published with heart blood and femoral blood concentrations of drug and HB/FB average ratios and ranges from those studies. The HB/FB ratio is now accepted as an indication of a drug's tendency to undergo PMR, and it is assumed that peripheral blood collected from the femoral or iliac veins is less affected by PMR than blood from the heart, aorta or vena cava. Dr. Randall Baselt now includes summaries of published HB/FB ratios in drug monographs in his reference books: *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*.

Some toxicologists and pathologists, misunderstanding the concept, believed that the peripheral blood was not affected by PMR and that drug concentrations measured in femoral vein blood were unchanged from concentration at the time of death. Others have examined the HB/FB ratio in an individual case and concluded that because that ratio was near 1, PMR did not occur in that case. Those beliefs have been shown to be incorrect for drugs that have been studied, and it cannot be reliably assumed for any drug. The misunderstanding leads to serious errors in interpreting postmortem drug concentrations.

Research conducted in my laboratory in Miami, Florida and in other postmortem toxicology laboratories has shown that, for many drugs, peripheral blood collected from the iliac or femoral veins has drug concentrations higher than those that existed at the time of death. When interpreting postmortem drug concentrations, whether from peripheral or central blood, toxicologists and pathologists should not compare postmortem drug concentrations to concentrations measured in clinical studies. Such comparisons are likely to lead to the erroneous conclusion that the postmortem drug concentrations are too high to result from a therapeutic administration and that the case must have been an overdose.

This presentation will discuss some pharmacokinetics relationships that often are improperly applied to postmortem drug concentrations and will show some examples to illustrate how the resulting errors affect interpretation. It will also show a case that demonstrates the magnitude of PMR using pharmacokinetic calculations applied to drug concentrations in blood obtained before death occurred.

Ideally, postmortem drug concentrations should be compared to published concentrations from cases in which the cause of death was unequivocal. One such source is the article published by Druid and Holmgren in the *Journal of Forensic Sciences* (Attached).

One of the most common and most serious errors made by toxicologists and pathologists is the attempt to draw conclusions about cause of death solely from postmortem drug concentrations while ignoring or failing to consider conflicting evidence from the case investigation and the autopsy. All evidence should be considered if the best interpretation is to be accomplished. For example, when death results from respiratory depression one expects the lungs to be congested with serous fluid and have weights much higher than when death results from cardiac arrest. Individual lung weights on the order of 350 to 500 grams each in an adult are inconsistent with a respiratory depression death, but lung weights of 600 to 1000 grams each would be consistent with that cause of death. Conversely, sudden cessation of blood flow resulting from a cardiac event will typically result in lungs that are not edematous unless prolonged cardiopulmonary resuscitation was attempted.

Sometimes, when the interpretation remains uncertain, the laboratory may need to analyze additional samples to gain a better understanding of the distribution of the drug or drugs in the decedent. Blood specimens from both peripheral and central sites may be helpful. In some cases, it may be useful to analyze vitreous humor or solid tissues, such as liver or muscle to obtain a better understanding of the distribution and redistribution of the drug. It may also be helpful to measure the total amount of drug remaining unabsorbed in the stomach. A case will be presented in which analysis of stomach contents provided important information about the manner of death.

An awareness of postmortem changes and how they affect drug concentrations should provide a basis for interpretation of postmortem toxicology results and will help to avoid errors in interpretation that could result in incorrect decisions in court.

ABORDAJE DE CASOS RELACIONADOS CON NUEVAS SUSTANCIAS PSICOATIVAS (NSP)

Autores: David Hernández, Johanna Dallos. Grupo de Estupefacientes, Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses – Regional Bogotá

Introducción: La aparición de las denominadas Nuevas Sustancias Psicoactivas (NSP) son un hecho en las estadísticas forenses del análisis de sustancias incautadas a nivel mundial, siendo ésta la mayor amenaza relacionada a todos los problemas relacionados con el narcotráfico actual. En Colombia la mayoría de NSP son de origen sintético, estando éste fenómeno mayormente asociado al uso de estos derivados como sucedáneos de drogas psicoactivas de uso tradicional (LSD, MDMA, Marihuana, Mefedrona).

Objetivo: Desarrollar una metodología analítica que permita determinar el abordaje de casos relacionados con Nuevas Sustancias Psicoactivas (NSP), utilizando pruebas de identificación preliminar homologadas (PIPH) y prueba confirmatorio, cromatografía de gases acoplada a masas.

Materiales y métodos:

- Sustancias de referencia representantes de cada grupo de NSP: JWH-073, m-CPP, 2CE, DOI, LSD, Mefedrona, DOB, Ketamina, PMMA, 2CB, Mescalina, Fenciclidina y PMA.
- Sustancias debidamente caracterizadas con las que no se cuenta patrón de referencia: Yagé (DMT, Harmina y Harmalina), Metilona, 6-APB, 25-I-NBOMe, DOX y 25-C-NBOMe.
- Etanol, metanol y solventes adecuados para solubilizar y extraer las sustancias en mención.
- Solución de tetracosano de 1000mg/L como estándar interno.
- Reactivos para reacciones preliminares (orientativas): Marquis, Dragendorff, Simon's, Liebermann's, Mandelin's, p-dimetilaminobenzaldehído, Mecke's.
- Cromatografo de gases con detector de masas, Marca Thermo Scientific, Modelo: Trace 1300/ISQ, Serial 713100018.
- Cromatografo de gases con detector de Masas, Marca: Agilent Technologies, Modelo: 6890N/5973N Serial: US10139069.

Discusión y Resultados: El abordaje de casos relacionados con NSP representan un nuevo hito para los laboratorios de ciencias forenses encargados del análisis de drogas incautadas, por tanto, es de suma importancia generar una metodología que permita su adecuado manejo. Para ellos se realiza una separación y descripción detallada del material incautado. Posteriormente, si la cantidad lo permite, se realiza un screening de pruebas preliminares y posteriormente se analiza con una técnica cromatográfica adecuada, que permita una buena resolución entre sustancias mezcladas, para garantizar así su identificación sin que ninguna quede excluida. En el laboratorio se creó una metodología que permite la óptima separación de las sustancias mencionadas en el parágrafo de materiales y métodos.

Casos Forenses: Se han identificado casos de LSD adulterados con sustancias de las series 25-XNBOMe, y DOX, así como casos de tabletas simulando MDMA que contiene metilona y 6APB, entre otros.

Conclusión:

Se creo una metodología cromatográfica adecuada para la separación de un buen número de sustancias representativas de los diferentes grupos de NSP, así como una propuesta de abordaje de los casos.

STATE-OF-THE-ART IN DETECTING DRIVING UNDER THE INFLUENCE OF ALCOHOL AND DRUGS

Alain Verstraete¹

¹Department of clinical chemistry, microbiology and immunology, Ghent University and Department of laboratory medicine, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium
E-mail: alain.verstraete@ugent.be

References

- [1]http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9782940395002_eng.pdf?ua=1
- [2]http://www.who.int/substance_abuse/drug_use_road_safety/en/#

Every year, 125 million road deaths occur in the world. Drinking and driving is one of the main causes of road crashes worldwide. In high-income countries about 20% of fatally injured drivers have excess alcohol in their blood, in some low- and middle-income countries up to 69%. Studies have shown that the risk of being involved in a crash increases exponentially with increasing alcohol concentrations, at 0.5 g/L, the risk is doubled, at 0.8 g/L it is 5x higher, at 1.2 g/L it is 10x higher and at 2 g/L, it is 80x higher. The median blood alcohol concentration in injured or killed drivers is 1.6 g/L. For drugs the risk is two to five times higher, with higher risks for people who combine alcohol and drugs. For alcohol, most countries have a per se legislation, with legal limits most often between 0.2 and 0.8 g/L. Driving under the influence of drugs (DUID) legislation can be subdivided into two categories: in impairment-type laws, the prosecution has to prove that the driver was impaired, or unfit to drive or under the influence of a substance. In per se type laws the presence of a drug in the blood of the driver constitutes an offence.

For detecting drivers under the influence of alcohol, most countries use breathanalysis. For drugs, checklists of signs of recent drug consumption can be used, and several countries have introduced roadside oral fluid (OF) testing. For the confirmation analysis, most countries use blood, some use OF. A lot of research and development has been performed in the last 15 years and the nature of the drug molecules found in OF, the expected concentrations and relationship with blood concentrations and impairment are now better understood. The quality of onsite tests for detecting drugs in OF has improved and some tests can now detect 5 g/L of THC in OF. Random roadside testing shows promising results in changing driver behaviour in Australia, and an increasing number of countries have introduced roadside oral fluid drug testing in their legislation. For granting driver's licences to people who have lost them because of DUID or drug-related offences, several countries use hair analysis in order to determine whether the driver has used drugs in the last three months. WHO road safety manuals on drinking and driving and on DUID are available [1, 2].

AVANCES EN LA IMPLEMENTACIÓN DE LA LEY DE REGULARIZACIÓN DEL CANNABIS 19.172/2013 EN URUGUAY.

Umpiérrez, E.

1Unidad de Medio Ambiente, Drogas y Doping, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
eumpierr@fq.edu.uy

El 20 de diciembre del 2013 el Gobierno de Uruguay aprueba la ley 19172 que trata sobre el: CONTROL Y REGULACIÓN DEL ESTADO DE LA IMPORTACIÓN, PRODUCCIÓN, ADQUISICIÓN, ALMACENAMIENTO, COMERCIALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN de MARIHUANA Y SUS DERIVADOS.

Esta ley en el artículo 2 define que deroga el Decreto-Ley Nº 14.294, de 31 de octubre de 1974 y sus leyes modificativas, el Estado asumirá el control y la regulación de las actividades de importación, exportación, plantación, cultivo, cosecha, producción, adquisición a cualquier título, almacenamiento, comercialización y distribución de cannabis y sus derivados, o cáñamo cuando correspondiere, a través de las instituciones a las cuales otorgue mandato legal, conforme con lo dispuesto en la presente ley y en los términos y condiciones que al respecto fije la reglamentación.

En el artículo 17 dice Créase el Instituto de Regulación y Control del Cannabis (IRCCA), como persona jurídica de derecho público no estatal. Y define sus funciones

El 6 de mayo del 2014 se aprueba el decreto reglamentario en cannabis no medicinal y este reglamenta el cultivo individual para uso personal, los clubes de membresía cannábicos y la dispensación por Farmacias de cannabis psicoactivo para uso personal. Además se reglamenta su no uso laboral, su no uso en conducción, su no uso en instituciones educativas, las campañas de información sobre el uso de sustancias psicoactivas, y se asimila el fumado de cannabis al fumado de tabaco en lo que respecta a las prohibiciones ya existentes y futuras.

El 4 de febrero del 2015 se emitió el Decreto 46/2015 reglamentario del Cannabis medicinal para uso en investigación y uso terapéutico e involucra al MSP y al IRCCA

Algunos indicadores

A la fecha ya se han implementado el auto cultivo con más de 5.214 personas registradas a setiembre del 2016.

Se han creado 20 clubes Cannábicos.

Se ha plantado cannabis psicoactivo por dos empresas autorizadas por el IRCCA y se está en la etapa de distribución por las Farmacias.

No se ha podido avanzar con el cannabis para investigación ya que el comité de Ética del MSP ha rechazado 4 proyectos porque exige que si el "fármaco" es eficaz, el grupo de investigación deberá suministrárselo sin cargo al voluntario mientras le sea necesario.

Referente al cultivo y explotación de cannabis medicinal hay empresas interesadas pero el MSP no ha fijado los requisitos que se deben cumplir.

"SITUACIÓN DE LA MARIHUANA EN EL PARAGUAY: PROYECTO DE DESPENALIZACIÓN, USO MEDICINAL Y RECREACIONAL"

Insaurralde, M.; Díaz Gill Medicina Laboratorial SA Laboratorio de Toxicología
toxiforens@diazgill.com.py marizain@gmail.com
Asunción-Paraguay

Situación actual: En el Paraguay la Ley 1340/88 que modifica, adiciona y actualiza la Ley Nº 357/72, "QUE REPRIME EL TRAFICO ILICITO DE ESTUPEFACIENTES Y DROGAS PELIGROSAS Y OTROS DELITOS AFINES Y ESTABLECE MEDIDAS DE PREVENCIÓN Y RECUPERACION DE FARMACODEPENDIENTES" vigente desde el año 1988 es la que regula todo lo referente a los estupefacientes y drogas peligrosas, entre ellas la marihuana. Considerando ésta Ley, el consumidor de marihuana no es un delincuente, siempre y cuando la tenencia para el consumo no sea mayor a los 10 gramos, nivel máximo establecido por la ley antes mencionada. Basado en esto el consumo controlado de marihuana no está penado, si la producción y comercialización.

La Secretaría Nacional Antidrogas (SENAD), dependiente de la Presidencia de la República, tiene la misión de ejecutar la política del gobierno para la reducción del consumo indebido de drogas y del combate a la producción y el tráfico ilícito de drogas peligrosas.

Proyecto de despenalización: Se presentó en la Cámara de Diputados del Paraguay un proyecto de Ley para despenalizar el cultivo de marihuana con fines de consumo personal. La Comisión de Ciencia y Tecnología de la Cámara de Diputados recibió a representantes de la Secretaría Nacional Antidrogas (SENAD), el Ministerio del Interior y del Movimiento Pro-Cannábico "Quiero ser legal" para debatir sobre la eventual despenalización del cultivo del cannabis para consumo personal. La Ley paraguaya es contradictoria en cuanto a la marihuana, ya que permite la posesión de hasta 10 gramos, pero a la vez castiga con entre 10 y 20 años de prisión a quien cultive, siembre o comercialice.

Uso medicinal: En mayo de éste año la empresa Medical Marijuana, Inc. anunció que su producto Real Scientific Hemp Oil™ (RSHO™) ha sido autorizado por el gobierno del Paraguay para la importación al país como medicamento bajo receta médica, constituyendo el primer permiso de importación en la historia de Paraguay en aprobar el aceite de cannabidiol (CBD) para el tratamiento de la epilepsia, mal de Parkinson, dolor crónico y cáncer. El aceite de cannabis es una medicación que aún no figura en los registros del Ministerio de Salud de Paraguay, por lo que la reglamentación contempla que se realice la importación necesariamente con autorización.

Uso recreacional: Está permitida la tenencia (hasta 10 gramos) para uso recreacional (fumada, ingerida por vía oral o inhalada). Las organizaciones pro-cannábicas buscan informar a la ciudadanía sobre los beneficios del uso responsable y consciente del cannabis en sus diferentes presentaciones.

Conclusiones: La Ley vigente hace una diferenciación entre la posesión con fines de consumo (hasta 10 gramos) y la posesión con fines de tráfico (superior a 10 gramos), sin embargo varios legisladores manifiestan que existen lagunas jurídicas en las leyes actuales, como la autorización de tener hasta 10 gramos de marihuana, mientras que sembrar, cultivar y comercializar tiene una pena que va de 10 a 20 años. Se han presentado proyectos de Ley para la despenalización del cultivo del cannabis, así como también para la modificación de la Ley 1340/88.

ISRAEL SE PREPARA PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE CAMBIOS EN LA LEY DE REGULACIÓN DE CANNABIS MEDICINAL

Ester Schallmach, PhD.

Laboratorio de Toxicología y Farmacología Clínica, Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Israel

A partir de abril 2017 entrará en vigor la reforma de la ley de Cannabis medicinal en Israel. En la actualidad, solamente un médico autorizado por el Ministerio de Salud puede recomendar al paciente el uso de Cannabis medicinal. Con la recomendación, el paciente recibe del Ministerio de Salud una licencia para adquirir Cannabis medicinal de un productor habilitado por el mismo Ministerio. La licencia otorgada al productor es exclusivamente administrativa y no incluye procesos de control de calidad. El productor suministra al paciente un producto de acuerdo a la enfermedad, sin ninguna base científica, sino en un proceso de prueba y error.

La reforma de la ley considera al Cannabis medicinal como una droga peligrosa. Cada etapa del proceso, desde el cultivo de las plantas hasta el expendimiento del producto final en farmacias, deberá realizarse en condiciones de GAP (Good Agricultural Practice), GMP (Good Manufacturing Practice), GDP (Good Distribution Practice), con certificado de control de calidad de un laboratorio ISO17025. El certificado deberá detallar el contenido de distintos componentes canabinoides y su concentración, exámen microscópico (insectos y estado de los tricomas de la

planta), análisis de metales pesados, pesticidas y bacteriológico (bacterias y hongos).

La producción anual estará limitada por el Estado a través de licitaciones. Los cultivadores venderán al Estado su producción y éste a los productores del Cannabis medicinal. El excedente será destruido por la policía.

La empresa elaboradora de los distintos productos medicinales deberá tener un permiso para drogas peligrosas. Los productos se venderán a droguerías y éstas distribuirán los productos a las farmacias.

Las farmacias venderán directamente el producto al paciente con una receta expedida a su nombre por su médico. De esta manera, se elimina la relación existente hasta ahora entre el productor y el paciente.

El número de cultivadores se limitará cuando despierte sospechas de un posible perjuicio a la comunidad. El número de productores, droguerías y farmacias no estará limitado.

En Israel, el Cannabis medicinal está limitado a un número de enfermedades. A diferencia de USA y Canadá, no existe la

posibilidad abierta del médico de recetarla para alguna enfermedad no listada.

La nueva ley permite la investigación para el uso en otras enfermedades como para cualquier medicamento nuevo. Sólo después de que se haya demostrado su efectividad para una enfermedad específica, ésta se agregará por ley al listado.

NPS COMO ENFRENTAR EL PROBLEMA. EXPERIENCIAS EN URUGUAY

Umpiérrez E

Unidad de Medio Ambiente, Drogas y Doping, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
eumpierr@fq.edu.uy

Se ha observado en todo el mundo, un crecimiento exponencial respecto al consumo de Nuevas Sustancias Psicoactivas (NPS). Según el balance 2015 de la UNODC hasta finales de 2015, fueron más de 600 las sustancias pertenecientes a esta familia, cuya aparición se reportó en más de 100 países. UNODC viene incluyendo estas sustancias en las listas de sustancias prohibidas a una velocidad de 15 a 20 por en los pasados años.

Con el objetivo de investigar cuáles de las NPS efectivamente se están consumiendo en el mercado Uruguayo y que grado de adulteración poseen, se planificaron tres acciones complementarias:

1-La implementación de un Sistema de Alerta Temprana por parte del Observatorio Nacional de Drogas de la Secretaría de Drogas de Presidencia de la República, integrado el sistema por Poder Judicial, Ministerio de Salud Pública, Ministerio del Interior, Ministerio de Educación y Cultura, Dirección de Aduanas, Universidad de la República; donde cada uno de ellos reporta al resto sus hallazgos al respecto en una plataforma virtual cerrada.

2-Un proyecto que permitió monitorear que sustancias se consumen en una extensa población durante una fiesta electrónica. El estudio consistió en muestrear los efluentes generados en el transcurso de una fiesta de electrónica llevado a cabo el presente año en el territorio Uruguayo.

3-Una propuesta piloto de montar un laboratorio portátil durante otra fiesta electrónica multitudinaria en donde se hicieron ensayos en tiempo real para alertar sobre adulteración de comprimidos o la presencia de sustancias desconocidas.

La ponencia amplió la información relevante en cada propuesta así como sus puntos fuertes y sus debilidades.

HAY EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN EL CEREBRO DE USUARIOS CRÓNICOS DE COCAÍNA.

Carl J. Schmidt¹, Michael J. Bannon², Candace L. Savonen²

1. Department of Pathology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.

2. Department of Pharmacology, Wayne State University School of Medicine, Detroit, Michigan, U.S.A.

Introducción: Se cree que el abuso crónico de drogas está ligado a cambios a largo plazo en la expresión de genes en neuronas, sobre todo en aquellas que forman parte de las vías afectadas por los fármacos relevantes. El cerebro humano postmortem constituye un recurso único para elucidar la fisiopatología de la adicción.

Métodos: Analizamos los perfiles de expresión genética en el mesencéfalo de casos positivos para cocaína y los comparamos con los de sujetos control, es decir, negativos para cocaína y de edad y sexo similares usando microarrays y PCR cuantitativo. Los microarrays permiten el escrutinio de un gran número de secuencias de ADN. Un número pequeño de genes se expresaron de forma diferencial y robusta. Estos genes incluyeron entre otros, secuencias para la tirosina hidroxilasa, el transportador de dopamina, forkhead box A2 (un activador de transcripción de ciertas proteínas), la variante H3 de la familia de histonas 3B (una proteína nuclear estructural), y otros más.

Resultados: La abundancia de los productos de transcripción de aproximadamente la mitad de estos genes expresados diferencialmente fueron lo suficientemente diagnósticos para asignar a sujetos al grupo de usuarios de cocaína vs. grupo de control. Para empezar a diferenciar la contribución relativa de procesos patológicos crónicos en contraste a eventos perimortem en los cambios observados en la expresión genética, la expresión de numerosos genes candidatos en los usuarios crónicos de cocaína que murieron por heridas de arma de fuego se compararon con la de sujetos cuya muerte fue

atribuida al consumo de cocaína. La abundancia de los factores de transcripción de estos genes fue lo suficientemente diferente como para ser diagnóstica del uso de cocaína independientemente de la causa de muerte.

Discusión: Muchos (pero no todos) los genes candidatos estudiados fueron expresados diferencialmente en los consumidores crónicos de cocaína, independientemente de su causa inmediata de muerte o niveles perimortem de cocaína, lo que sugiere que pueden representar cambios fisiopatológicos intrínsecos al uso crónico de drogas. La identificación de un patrón molecular asociado a los cambios fisiopatológicos que se producen en el cerebro de los usuarios de drogas puede contribuir al desarrollo de marcadores biológicos de muertes por drogas y nuevas modalidades terapéuticas para el tratamiento de la adicción a drogas. Además, es posible que con un examen de laboratorio se puedan identificar individuos que mueren por consecuencias fisiológicas del uso de drogas a largo plazo aún con toxicología negativa en la autopsia.

En Israel, el Cannabis medicinal está limitado a un número de enfermedades. A diferencia de USA y Canadá, no existe la posibilidad abierta del médico de recetarla para alguna enfermedad no listada.

La nueva ley permite la investigación para el uso en otras enfermedades como para cualquier medicamento nuevo. Sólo después de que se haya demostrado su efectividad para una enfermedad específica, ésta se agregará por ley al listado.

STRATEGIES FOR LC-(HR)-MS-BASED SCREENING APPROACHES

Hans H. Maurer

Department of Experimental and Clinical Toxicology, Saarland University
D-66421 Homburg (Saar), Germany, hans.maurer@uks.eu

High-resolution mass spectrometry (HRMS) using double focusing mass analyzers was established in the 1960ies and revolutionized the elemental analysis of organic compounds. It became a powerful tool also in bioanalytical research and practice providing high selectivity and specificity. After developing modern LC-MS interfaces using electrospray ionization and its wide application in bioanalytical as well as in "omics" research and practice, the manufacturers realized a broad market for HRMS. Since the last few years, robust LC-MS apparatus mainly using time-of-flight or Orbitrap mass analyzers are getting more and more affordable to many laboratories. This is also represented by the remarkable increase of publications and review articles. Therefore, the aim of the presentation will be to give an overview on the current strategies for LC-HRMS-based drug screening approaches. Limitations and further perspectives will close the presentation.

References

Maurer HH, Meyer MR (2016) High-resolution mass spectrometry in toxicology - current status and future perspectives. *Arch Toxicol* 90:2161-2172

Meyer MR, Maurer HH (2016) Review: LC coupled to low- and high-resolution mass spectrometry for new psychoactive substance screening in biological matrices - Where do we stand today? *Anal Chim Acta* 927:12-20

Meyer MR, Helfer AG, Maurer HH (2014) Current position of high-resolution mass spectrometry for drug quantification in clinical & forensic toxicology [review]. *Bioanalysis* 6:2275-2284

Meyer MR, Maurer HH (2012) Current applications of high-resolution mass spectrometry in drug metabolism studies [review]. *Anal Bioanal Chem* 403:1221-1231

Helfer AG, Meyer MR, Michely JA, Maurer HH (2014) Direct analysis of the mushroom poisons alpha- and beta-amanitin in human urine using a novel on-line turbulent flow chromatography mode coupled to LC-high resolution-MS/MS. *J Chromatogr A* 1325:92-98

Helfer AG, Michely JA, Weber AA, Meyer MR, Maurer HH (2015) Orbitrap technology for comprehensive metabolite-based liquid chromatographic-high resolution-tandem mass spectrometric urine drug screening - exemplified for cardiovascular drugs. *Anal Chim Acta* 891:221-233

Helfer AG, Michely JA, Weber AA, Meyer MR, Maurer HH (2016) LC-HR-MS/MS standard urine screening approach: Pros and cons of automated on-line extraction by turbulent flow chromatography versus dilute-and-shoot and comparison with established urine precipitation. *J Chromatogr B* DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.06.036

Maurer HH, Meyer MR, Helfer AG, Weber AA (2016) Maurer/Meyer/Helfer/Weber MMHW LC-HR-MS/MS library of drugs, poisons, and their metabolites. Wiley-VCH, Weinheim (Germany)

IMPACT OF DRUG-DRUG INTERACTIONS ON THE INTERPRETATION OF CLINICAL OR FORENSIC CASES.

Hans H. Maurer

Department of Experimental and Clinical Toxicology, Saarland University
D-66421 Homburg (Saar), Germany, hans.maurer@uks.eu

The ongoing progress in analytical and life sciences opens new perspectives in clinical and forensic toxicology. In times of personalized medicine, the interpretation of analytical results in clinical and forensic cases should be based also on the genotype/phenotype of an individual, influence of isoenzymes involved in their metabolism and membrane transport, and on further individual factors such as body mass, age, sex, kidney and liver function, and drug-drug (food-drug) interactions [1-3]. Detailed knowledge of all these factors is a prerequisite for evidence-based case interpretation. In this presentation, the principles of interactions and examples for their relevance in case interpretation as well as sources for assessing possible interactions will be presented.

References

1. Chwab M, Schaeffeler E (2012) Pharmacogenomics: a key component of personalized therapy. *Genome Med* 4:93

2. Sim SC, Ingelman-Sundberg M (2011) Pharmacogenomic biomarkers: new tools in current and future drug therapy. *Trends Pharmacol Sci* 32:72-81

3. Wong SH, Happy C, Blinka D, Gock S, Jentzen JM, Donald HJ, Coleman H, Jortani SA, Lucire Y, Morris-Kukoski CL, Neuman MG, Orsulak PJ, Sander T, Wagner MA, Wynn JR, Wu AH, Yeo KT (2010) From personalized medicine to personalized justice: the promises of translational pharmacogenomics in the justice system. *Pharmacogenomics* 11:731-737

BEST PRACTICES IN POSTMORTEM FORENSIC TOXICOLOGY

Daniel S. Isenschmid, Ph.D. F-ABFT NMS Labs 3701 Welsh Road
Willow Grove, PA 19090 USA

ABSTRACT : This presentation will discuss best practices in forensic toxicology is designed for both the forensic pathologist and toxicologist and will touch on several topics that will ultimately impact case interpretation. These include specimen collection, selection of containers, sample integrity, drug stability, postmortem redistribution, antemortem versus postmortem samples and case histories. Through several case examples, the attendee will learn the importance of not over interpreting the "numbers" reported by the toxicology laboratory, but to use a holistic approach to case interpretation.

NOVEL PSYCHOACTIVE SUBSTANCES: CURRENT TRENDS FROM NMS LABS

Daniel S. Isenschmid, Ph.D. F-ABFT NMS Labs
3701 Welsh Road Willow Grove, PA 19090 USA

ABSTRACT So-called "designer drugs" have provided forensic toxicologists with analytical and interpretive challenges for years. An early example of this was the substitution of alpha-methyl fentanyl "China White" for heroin. This occurred at a time before the internet was available to sell "legal" drugs and many toxicologists were lucky to have a GC-NP with a capillary column.

For the past 7 years toxicologists have been challenged with cases dealing with synthetic cannabinoids ("Spice, K-2"), designer stimulants ("bath salts, legal highs"), and more recently designer opiates and fentanyls, now collectively called Novel Psychoactive Substances (NPS). The types of compounds available are limited only by the ingeniousness of the chemists who synthesize them and the action of governments that rush to control them. Consequently, we currently have an "alphabet soup" of designer drugs, many of which bare the initials of the chemist / institution followed by a number (in the case of synthetic cannabinoids) or some kind of acronym for a long chemical name (in the case of designer stimulants) all sold in packaging that provides no clue to its ingredients.

Despite having a larger arsenal of "toxicology tools" today, challenges remain including the identification of metabolites, limited availability of standards and the ability to interpret results when human drug administration studies are difficult, if not impossible.

This presentation will focus on the current trends observed with these compounds in a large independent toxicology laboratory in the USA.

MODELS FOR STUDYING THE HUMAN METABOLISM OF NEW PSYCHOACTIVE SUBSTANCES

Hans H. Maurer

Department of Experimental and Clinical Toxicology, Saarland University D-66421 Homburg (Saar), Germany, hans.maurer@uks.eu
More and more new drugs of abuse (DOA) enter the illicit drug market. In contrast to medicaments approved by drug administrations, no safety pharmacology/toxicology testing is performed for DOA (chemically synthesized or herbal drugs) before distribution. Therefore, it is a task for institutions of clinical and forensic toxicology or doping control to study the pharmacology/toxicokinetics, especially the metabolism of such new DOA. Such metabolism studies are mandatory, as metabolites are often the target for (urine) drug screening and they can be pharmacologically active in addition or instead of the parent drug or they can show toxic effects. Finally, the extent of metabolism by the various phase I and II isoenzymes may markedly influence the acting time and the elimination. In this presentation, in vivo and various in vitro models/assays for drug metabolism studies, the pros and cons of GC-MS and LC-MS in drug identification, and recent examples will be presented [1-5].

References

1. Peters FT, Meyer MR (2011) *In vitro* approaches to studying the metabolism of new psychoactive compounds [review]. *Drug Test Anal* 3:483-495
2. Richter LHR, Kaminski YR, Noor F, Meyer MR, Maurer HH (2016) *Metabolic fate of desomorphine elucidated using rat urine, pooled human liver preparations, and human hepatocyte cultures as well as its detectability using standard urine screening approaches.* *Anal Bioanal Chem* 408:6283-6294
3. Schaefer N, Helfer AG, Kettner M, Laschke MW, Schlote J, Ewald AH, Meyer MR, Menger MD, Maurer HH, Schmidt PH (2016) *Metabolic patterns of JWH-210, RCS-4, and THC in pig urine elucidated using LC-HR-MS/MS - Do they reflect patterns in humans?* *Drug Test Anal DOI: 10.1002/dta.1995*
4. Meyer MR, Maurer HH (2012) *Current applications of high-resolution mass spectrometry in drug metabolism studies [review].* *Anal Bioanal Chem* 403:1221-1231
5. Dinger J, Meyer MR, Maurer HH (2016) *In vitro cytochrome P450 inhibition potential of methylenedioxy-derived designer drugs studied with a two cocktail approach.* *Arch Toxicol* 90:305-318

CRIMEN FARMACÉUTICO: UNA AMENAZA A LA SALUD PÚBLICA MUNDIAL

Ester Schallmach, Ph.D., Michal Rotenberg, Ph.D.

Laboratorio de Toxicología y Farmacología Clínica, Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Israel

La salud pública en todo el mundo está amenazada por productos medicinales falsificados. Algunos de estos productos carecen de ingredientes activos mientras que otros contienen contaminantes tóxicos. El crimen farmacéutico incluye producción, comercialización y distribución de medicinas o suplementos médicos falsificados, robados o ilícitos. Abarca la falsificación de productos medicinales, su empaquetamiento, documentación asociada, robo, fraude, contrabando, tráfico y comercialización ilícita y el lavado de dinero asociado a dichas actividades.

Las actividades de los falsificadores de medicamentos prosperan en países donde las leyes contra la falsificación son débiles, las agencias de regulación de medicamentos carecen de fondos y de personal y las sanciones legales son ineficaces.

Existen organizaciones internacionales que trabajan coordinadamente en la lucha contra el crimen farmacéutico. Asimismo,

muchos países poseen sus propios mecanismos para el control de estas actividades. En Israel, este control es llevado a cabo por la Unidad de Lucha contra el Crimen Farmacéutico, perteneciente al Ministerio de Salud.

Parte de las muestras incautadas en distintos operativos son analizadas en el Laboratorio de Toxicología y Farmacología Clínica, Sheba Medical Center, Tel Hashomer. Las muestras son analizadas por gas cromatografía-espectrografía (GC-MS) de masas. En casos especiales, análisis complementarios son realizados por HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), LC-MSMS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) o HS-GC (Head Space-Gas Chromatography).

El análisis de las muestras recibidas entre 2013-2015 revela que en el 50-60 % de las muestras estudiadas algún producto con actividad farmacéutica o toxicológica fue detectado. En general, fueron detectados esteroides anabólicos (12-18%), anorécticos (6-13%) y productos para la actividad sexual (8-14%) así como bebidas alcohólicas con alto contenido de metanol (2%). Las muestras fueron incautadas por la policía (30-40%), en la aduana (15%), en oficinas de correos (3-7%) u obtenidas por denuncias en hospitales (4-12%), clínicas privadas (4-10%) o farmacias (1-2%).

Development of an analytical method for detection of 16 adulterants in dietary supplements sold in Brazil, using HPLC-DAD

Idylla Tavares¹, Iolana Camprestrini¹, Mauricio Yonamine¹.
¹Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, São Paulo, Brazil.

Introduction: The presence of non-declared synthetic substances in the formulations of dietary supplements consists not only of a public health problem, but it also represents an issue for professional athletes, sports federation, and anti-doping laboratories. The aim of the present study is to develop a new analytical method based on a HPLC-DAD to detect 16 possible adulterants, including stimulants, diuretics, laxants and anabolic substances simultaneously, in dietary supplements sold in Brazil.

Method: The chromatographic method was optimized using a HPLC-DAD (Shimadzu, Japan), and a C18 column Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). The mobile phase consisted of phosphoric acid 0,09 %: acetonitrile, 85:15 (v v-1). A gradient elution, at constant flow of 1 mL min⁻¹ and temperature of 25°C, was optimized for appropriated chromatographic separation of all 16 target analytes. Detection wavelengths were set to 200, 228, 244 and 340 nm. Retention times and reference UV spectra were used for identification of each analyte. For the sample treatment, 500 mg of each matrix was dissolved in 5 mL of methanol. The mix was shaken for 1 min, sonicated for 30 min and then centrifuged for 5 min at 2500 rpm. An aliquot of supernatant was diluted 10-fold with the mobile phase. The 16 analytes and internal standards were spiked into the sample, mixed for 1 min, and 10 µL were then injected at the HPLC-DAD.

Results and Discuss: Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ), linear range, matrix effect (ME) and precision (intra and inter-day) were performed for all of 16 target analytes, and for three different composition supplements. The range of concentrations considered for this study were based on the therapeutic concentration (TC) of each analyte. The LOD and LOQ were between 10 and 20% of the TC for all substances and matrices, showing the applicability of the proposed method for identifying both adulteration and contamination levels in supplement samples. Analytical curves showed linearity between 0,1 µg mL⁻¹ to 120 µg mL⁻¹, varying for each analyte. The r² was higher than 0,99 for all substances. The method showed to be precise at both LOD and TC levels (RSD <15%).

Conclusions: *These preliminary results show the potential applicability of the analytical method based on HPLC-DAD for detection of contaminants as well as the intentional addition of active substances in different supplement samples. Besides using an accessible technic, the method proposes a simple sample treatment before analysis by HPLC-DAD.*

Análisis de la dinámica de consumo y caracterización de las drogas de abuso al interior de la Universidad Nacional de Colombia - sede Bogotá (UN-SB)

Alvaro J. Sierra¹, Karen A. Pérez¹, Jorge Ariel Martínez Ramírez^{1*}
¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. A.A. 14490, Bogotá D.C., Colombia.

*Correspondencia: Profesor Jorge Ariel Martínez Ramírez
e-mail: jamartinezra@una.edu.co. Teléfono: +(01157-1) 3165000. Ext 14628
Palabras Clave: Drogas de abuso, consumo, población universitaria, GC-EI/MS

Introducción: Estudios realizados en Colombia durante el 2012 revelan que el 33,9% de la población universitaria afirma haber consumido algún tipo de droga. Esta cifra resulta alarmante teniendo en cuenta la toxicidad que exhiben las drogas en si, como sus posibles adulterantes. Respondiendo a esta situación en la UN-SB se crea el proyecto 'conSumaconCien-cia', con el objetivo de identificar las drogas de abuso con sus posibles adulterantes que se consumen al interior del campus universitario y hacer una caracterización sociodemográfica de la población consumidora. Lo anterior con el fin de generar acciones preventivas que propendan disminuir el consumo o generar prácticas más seguras entre los consumidores.

Métodos: Las muestras junto a una encuesta con información epidemiológica fueron recolectadas dentro del campus de la UN-SB durante el I semestre de 2016. La recolección se llevó a cabo por abordaje directo al consumidor de manera voluntaria. La encuesta buscaba conocer la edad del usuario, sexo, frecuencia de consumo, lugar de adquisición de la droga, y tipo de droga de abuso consumida entre otros aspectos. Las muestras recolectadas se analizaron por medio de GC-EI/MS bajo las siguientes condiciones: Columna: HP-5MS (30m x 0,25mm IDx 0,25µm), split (20:1, 290 °C), fuente de ionización y cuadrupolo a 310 °C y 290 °C respectivamente. La rampa de calentamiento se adecuo según la droga de abuso analizada.

Resultados y Discusión: En total se analizaron 70 muestras. El 67% correspondió a Marihuana, 14% a cocaína, 3% a opiáceos, 14% a sintéticos y el 2% a otros. Mientras que la marihuana no presentó adulterantes, en cocaína se encontró levamisol, fenacetina y lidocaína. En las muestras rotuladas como LSD se encontró ketamina, MDMA, cafeína (también en opiáceos), y NBOMe. Además se encontró que el 26% de los usuarios no pertenecen a la universidad, un 35% adquiere la droga dentro del campus y el 50% indican confiar en la calidad de lo que adquieren.

Conclusión: *Los adulterantes encontrados pueden llegar a ser incluso más perjudiciales que la misma droga. Los resultados de cada muestra fueron entregados a cada usuario para generar la percepción de riesgo frente a la droga consumida y a Bienestar Universitario para emitir alertas tempranas y medidas de acción sobre consumo de drogas.*

Acute intoxication after alternative natural therapy for depression

Rafael Lanaro¹, Damila R. de Morais², Vinicius V. Hernandes², Elias. P. Tessaro², Deleon N. Correa², Cezar S. Gomes³, Marcos N. Eberlin², Jose Luiz Costa^{1,4}

1. Poison Control Center, University of Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brazil

2. ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, University of Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brazil

3. Brazilian Federal Police, Natal-RN, Brazil

4. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brazil

Introduction: Alternative health treatments using substances or procedures not scientifically proven, has been used by patients suffering from serious diseases, diseases where there is no effective medical treatment or those that have poor or no response to established medical treatments. How often are performed without medical monitoring and often use poorly studied substances, these treatments can cause poisoning and other risks to the health of the patient. The term Ayahuasca is used to refer to decoctions of the liana *Banisteriopsis caapi* plus *Psychotria viridis*. This beverage, used originally in religious ceremonies, has significant concentration of active substances. The term Kambo refers to a purification ritual, performed mostly at amazon region, where the secretion (named "Kambo vaccine" or "frog vaccine") collected from the skin of the frog *Phyllomedusa bicolor* is applied into the skin of the patient. In the present work, we report an acute intoxication episode after simultaneous submission to Ayahuasca and Kambo treatment.

Method: A 37 year-old woman was admitted to emergency service (ES) with visual hallucination, agitation, tremors of extremities, oral paresthesia, skin lesions and seizures. It was reported that she was submitted to an "alternative treatment for depression", where she ingested approximately 100mL of Ayahuasca and received five subcutaneous applications of Kambo. Diazepam was administered by ES and was effective to control the hallucination, but wasn't to agitation and seizures. The patient was asymptomatic after 6 hours and discharged 24h without any sequel.

Patient samples (urine, serum) and also the used materials where submitted to toxicological analysis, using liquid/liquid extraction, GC-MS and LC-MS/MS.

Results and Discuss: In patient's sample, it was detected N,N-dimethyltryptamine (3.2 ng/mL serum, 487.7 ng/mL urine), harmine (12.3 ng/mL serum, 60.6 ng/mL urine), harmaline (0.3 ng/mL serum, 49.4 ng/mL urine) and tetrahydroharmine (182.2 ng/mL serum, 567.4 ng/mL urine). No other drug of abuse or pharmaceutical (except diazepam) was detected in general unknown screening. In Ayahuasca, it was detected N,N-dimethyltryptamine, harmine, harmaline and tetrahydroharmine at concentrations of 678, 597, 132 and 1235 mg/L, respectively. High-resolution mass spectrometry analysis performed in Kambo sample detected the presence of two abundant peak, identified as the active peptides phyllomedusin and phyllocaerulein.

Conclusions: *The symptoms presented by the patient seem to have been produced by the joint action of the two materials. The use of alternative therapies is becoming more common, but the indiscriminate use of substances and materials have not been adequately studied can worsen the health condition of the patient.*

Desarrollo de metodología cualitativa para la determinación de herbicidas fenoxiácidos en madera mediante extracción QuEChERS y análisis por GC/MS

Navarro, A.; Castro, R.; Oreamuno, M.

Departamento de Ciencias Forenses (DCF), San Joaquín de Flores, Heredia, Costa Rica

Introducción: Los fenoxiácidos se utilizan para eliminar árboles con permiso de acuerdo con la Ley, pero la aplicación es ilegal en especies protegidas, lo que lo convierte en delito^{1, 2}. Se reportan metodologías para la identificación de fenoxiácidos, principalmente en granos, aguas y forraje para ganado. No existen metodologías específicas en madera, por lo que se necesitaba el desarrollo de la misma^{3,4}. El Organismo de Investigación Judicial (OIJ), ha recibido denuncias sobre el uso de estos herbicidas previo a la tala de especies maderables protegidas por Ley. Para la investigación criminal de estos delitos se necesita contar con una metodología confiable, por lo que se desarrolló y validó una metodología de extracción QuEChERS con detección por GC/MS para la determinación de herbicidas fenoxiácidos en matriz de madera Myroxyton balsamun.

Materiales y Métodos Se utilizaron estándares analíticos ChemService de 2,4-D; dicamba; picloram; 2,4,5-TP; 2,4-DB y 2,4,5-T, MTBSTFA Sigma-Aldrich y el kit comercial QuEChERS Phenomenex EN 15562 con una hidrólisis NaOH previa. El equipo utilizado fue GC7890A/MS 5975C. Software MassHunter, v B.07.03.2129.

Resultados y Discusión: Se seleccionó entre 4 distintos reactivos, el derivatizante para los analitos. MTBSTFA permitió obtener derivados más estables y de mayor masa molecular, óptimo para la detección por GC/MS⁵. Se optimizó el tiempo de incubación de la derivatización a 70 °C y se obtuvo una mayor respuesta a 60 min para cada analito. Para evaluar la limpieza de extracto, se realizó un diseño factorial completo, a dos niveles para tres factores, utilizando MgSO₄ anhidro, carbón grafitizado (GCB) y fase de sílica modificada (C18). Los resultados indican que es necesario el uso de los tres componentes para una limpieza óptima. Se validó el método con los criterios establecidos en el DCF. Se evaluó linealidad, homocedasticidad, límite de detección, límite de cuantificación, especificidad, selectividad y precisión. Se obtuvo el porcentaje de recuperación en la madera estudiada, con los resultados observados en el Cuadro I.

Cuadro I. Porcentaje de recuperación para cada analito en matriz.

Analito	Concentración (mg/L)	Porcentaje recuperación
Dicamba	4,98	116,8
MCPA	4,98	112,1
2,4-D	6,97	94,9
2,4,5-TP	5,32	78,2
2,4-DB	5,34	59,4
Picloram	5,94	73,2

Se evaluó el desempeño de la metodología en muestras reales de analizadas en la Sección de Química Analítica del DCF, en las cuales se detectó 2,4-D y 2,4,5-T.

Conclusión: *La metodología desarrollada para herbicidas fenoxiácidos, cumple con los criterios de aceptación de la validación. La limpieza de muestras, es un paso crítico y se minimiza las pérdidas por solubilidad.*

Los límites de detección resultaron por debajo del encontrado en casos reales, por lo que la metodología es óptima para la detección de los analitos.

Screening de nuevas sustancias psicoactivas y cocaína en muestras de orina en fiestas electrónicas en Uruguay.

Iglesias, F*; Dellepiane, L. Castro, M.J. Umpiérrez, E.
Unidad de Medio Ambiente, Drogas y Doping-Polo Tecnológico de Pando
Facultad de Química-UdelaR-Montevideo, Uruguay.
*figlesias@fq.edu.uy

Introducción: Se observa en el mundo, un crecimiento importante respecto al consumo de las Nuevas Sustancias Psicoactivas (NPS). Según el balance hasta finales de 2015, son más de 600 las drogas pertenecientes a este grupo, cuya aparición se reporta en más de 100 países.

Trabajos realizados por parte de la Unidad de Medio Ambiente, Drogas y Doping (UMADD), han demostrado que Uruguay no escapa de la influencia que éste tipo de sustancias ejerce, ni con ello, de los riesgos y daños asociados a su consumo.

Con el objetivo de investigar cuáles de las NPS efectivamente se encuentran circulando en Uruguay, se ejecutó un proyecto que permitió abarcar a una extensa población en un contexto socialmente reconocido de consumo como las fiestas electrónicas.

Métodos: El estudio consistió en muestrear los efluentes generados en el transcurso de una fiesta de electrónica llevado a cabo el presente año en el Uruguay. Para ello se instaló en el evento un baño químico previamente modificado, que hiciera posible la extracción de pool de orinas sin su alteración. Se tomaron 28 muestras, cada una representativa de 5 personas promedio en un total de 4 horas y media de fiesta. Una vez trasladadas al laboratorio se analizaron por un lado, por método de screening de ELISA (Inmunoensayo) y luego por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas, habiéndose aplicado previamente 3 procedimientos distintos de extracción líquido-líquido teniendo en consideración las posibles características fisicoquímicas de las sustancias buscadas. Previamente se pactó con las partes interesadas en el estudio una lista de 18 sustancias a buscar, no todas NPS y sobre ellas se trabajó.

Resultados y Discusión: De las 28 muestras analizadas; todas contenían metabolitos de THC; 23 Cocaína, 20 Metilendioximetanfetamina (éxtasis), 3 Ketamina, 3 Anfetamina, 3 Cannabinoides Sintéticos, entre otros en menor proporción. También se encontraron en gran proporción numerosos adulterantes y diluyentes que se entiende muchos significan un potencial problema adicional.

Los resultados obtenidos tras este estudio, si bien no permiten cuantificar el consumo ni extrapolarlo a la población en general; cumplen con el objetivo de brindar información cualitativa respecto de la naturaleza de las sustancias que los Uruguayos pueden acceder. Muchas de ellas no incluidas en las listas de sustancias prohibidas de Uruguay.

Conclusión: El conocimiento generado es de gran utilidad para alertar a las autoridades sanitarias tendientes a estar mejor preparados frente a los riesgos y daños potencialmente asociados y para el gobierno en la elaboración de reglamentación y políticas públicas.

Determinación de Cobalto en Orina de Caballo por Digestión en Microondas y Espectrometría de Absorción Atómica por Horno de Grafito (GFAAS)

Umpiérrez, E1; Díaz, D1*; Castro, M. J.1; Ronzoni, S1
1 Unidad de Medio Ambiente, Drogas y Doping; Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
*ddiaz@fq.edu.uy

Introducción: Una de las formas de aumentar y mejorar las capacidades deportivas en competiciones es mediante el dopaje, esto implica el uso de sustancias químicas que mejoran la performance deportivas. Una de las sustancias más usadas actualmente son las que aumentan la cantidad de glóbulos rojos que se encuentra en sangre utilizando productos tales como sales de cobalto.

Si bien el Cobalto se encuentra formando parte de la vitamina B12, se puede suministrar como proteínato o sales. Por esta razón, se estableció como límite máximo permitido internacionalmente la concentración de 100ng/ml de cobalto total en orina de equino. Actualmente en Uruguay no se está penalizando un exceso en la concentración de este metal. Este estudio busca conocer los valores basales que pueden ser encontrados actualmente.

Método: Para la determinación de cobalto se utilizó un equipo de absorción atómica con horno de grafito, Varian 240. Los patrones se realizaron a partir de una sal de cobalto de alta pureza en un rango de 0-100 ng/ml. La elección del rango se justifica debido a que tanto las muestras como los patrones, fueron digeridos previamente en un horno microondas Ethos One, Milestone. Las mismas son llevadas a volumen, por lo que se adecuan a la dilución que se realizan a las muestras. Al procesar todo de igual manera se asegura de minimizar las posibles pérdidas en el análisis y evitar el uso de factores de dilución distintos entre muestras y controles. Solo se realiza una dilución para llevar a rango aquellas muestras cuyas concentraciones dieron mayor al rango descripto.

Las muestras de orina analizadas provienen de caballos de carreras deportivas que nuestra Unidad analiza de forma rutinaria en control de doping.

Resultados: Se analizaron un total de 50 orinas en el año 2016 por este método. Se encontró que 30 muestras de las analizadas tenían una concentración por encima del máximo valor permitido, en algunos casos un factor de 10 veces mayor llegando a un máximo de concentración de 1687.7 ug/mL en orina.

Discusión y Conclusión: Actualmente en Uruguay el Cobalto no está incluido en las listas de sustancias prohibidas. Su uso no solo tendría como efecto mejorar las capacidades competitivas del equino si no que en exceso podría perjudicar su salud. A partir del primero de Enero del 2017 la Federación Ecuestre Internacional la incluirá en la lista de sustancias prohibidas.

Development and validation of the first method to analysis of NBOMes in dried blood spots (DBS)

Kelly F. da Cunha¹, Jose Luiz da Costa^{1,2}
¹Campinas Poison Control Center, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil
²Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

Introduction: NBOMes, N-benzylmethoxy derivates of the 2C hallucinogens family, have been used as a legal alternative to lysergic acid diethylamide (LSD). A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method has been developed and validated for the quantitative analysis of seven NBOMes (25C, 25H, 25I, 25B, 25G, 25D and 25E-NBOMe), in human dried blood spot (DBS) samples.

Method: For method development and validation, spiked whole blood (15 µL) was applied in 6 mm disks, previous picked from Whatman 903 Protein Saver cards. DBS disks were dried for 3 hours at room temperature. The extraction of analytes was performed with 300 µL of methanol-acetonitrile mixture (75:25, v/v), containing the internal standard (LSD-d₃, 0.5ng/mL). This mixture was vortexed for 10min and centrifuged at 10.000 rpm for 5min. The organic phase (150 µL) was transferred to LC vials, and 10µL injected on LC-MS/MS (Agilent 1260 Infinity coupled to ABSciex 5500QTRAP). Separation was performed in C18 column (Atlantis T3, 150 x 3mm, 3µm, Waters®) and gradient elution (acetonitrile water with 0.1% formic acid) with a flow rate of 0.5 mL/min. Mass spectrometer was set to operate in multiple reaction monitoring mode (positive electrospray ionization). Method validation was performed following recommendations from Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) for quantitative analysis.

Results and Discuss: During the method development, we decide to use fixed blood volume and whole spot analysis, in order to minimize the hematocrit effect. Method limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were 0.05 and 0.1ng/mL, respectively. Linearity was obtained from 0.1 to 10ng/mL for all NBOMes ($r > 0.99$, 1/x₂weighted linear regression). The precision (within-run and between-run, %RSD) and bias (%) were evaluated at 3 different concentrations (0.3, 2 and 8ng/mL), and weren't higher than 18%, respectively. No interference was observed when LOQ was analyzed in presence of 500ng/mL of other drugs of abuse and pharmaceuticals. The matrix effect varied between 88.6-150.5% for low QC and 104.1-164.6% for high QC. No carryover was observed.

Conclusion: From the best of our knowledge, this is the first developed and validated method to the analysis of NBOMes in DBS. The presented procedure will be applied to investigate de stability of NBOMes in dried matrix.

Determinación de cobre en huesos de trabajadores fallecidos.

Navarro, A.; Castro, R.; Oreamuno, M.
Departamento de Ciencias Forenses (DCF), San Joaquín de Flores, Heredia, Costa Rica
Claudio Lobos G.1, Eduardo Torres S.2, Eddie Vargas M.2
¹ Unidad de Instrumentación y Nuevas Tecnologías, Servicio Médico Legal, Santiago, Chile.
² Unidad de Toxicología, Servicio Médico Legal, Santiago, Chile.

Introducción: La minería es una de las actividades económicas más importantes de Chile, sin embargo, dicha actividad conduce a grandes impactos ambientales, que han dado lugar a múltiples acciones legales que han requerido la contribución de la Toxicología Forense.

Objetivos: Evaluar el contenido de cobre en diferentes tipos de huesos humanos obtenidos a partir de un procedimiento de autopsia de 14 trabajadores expuestos de una fundición de cobre.

Métodos: se estudió seis tipos huesos divididos en dos grupos: huesos esponjosos y huesos corticales. En relación con el primer grupo o de huesos esponjosos, se consideran cresta ilíaca, costilla, y la epífisis del fémur, mientras que el segundo grupo o de huesos corticales estuvo constituido por: falange media del dedo índice, tibia (diáfisis) y temporales en huesos obtenidos de de exhumaciones llevadas a cabo por orden de los tribunales penales. La determinación de cobre (Cu) se realizó mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito (AAS/GF) en 0,5 g de muestras de huesos humanos, por triplicado, previa pulverización criogénica y digestión asistida por microondas con ácido nítrico Suprapur® y peróxido de hidrógeno. La determinación de los siguientes parámetros de calidad: especificidad, linealidad, sensibilidad, límite de detección y cuantificación, repetibilidad, precisión intermedia y exactitud fueron obtenidos por medio de adición estándar de distintas concentraciones en huesos de individuos no expuestos (hueso blanco).

Resultados: los niveles de Cu en algunos huesos estudiados fueron significativamente mayores en trabajadores expuestos, en comparación con las personas no expuestas ocupacionalmente utilizadas como referencia (0,5 a 5,2 mcg /g peso seco). Las concentraciones de Cu más elevadas entre los trabajadores se observó en cresta ilíaca (58,0 a 322,0 mcg/g peso seco), tibia (diáfisis) (59,0 a 693,4 mcg/g, peso seco) y epífisis del fémur (4,6 a 5012,1 mcg/g, peso seco).

Conclusiones: La metodología para la determinación de Cu en hueso humano fue debidamente validada y los parámetros de calidad obtenidos hacen que esta metodología sea adecuada para el análisis forense. Las concentraciones de cobre son mayores en huesos de tipo esponjoso que en los de tipo cortical. El color verde se observa en algunos de estos huesos y el deterioro de la salud de los trabajadores del cobre antes de la muerte (enfermedad hepática, desbalance en metabolismo de zinc) se explica por la mayor concentración de cobre detectado en los trabajadores expuestos de la fundición de cobre.

Determination of opiates in real and reference hair samples by solid phase extraction (SPE) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Flávia L. Roveri ¹, Mauricio Yonamine ¹.

¹Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, São Paulo, Brazil.

Introduction: Opiates are originally derived from the *Papaver somniferum* plant and they comprise a group of compounds that influence perceptions of pain and euphoria. In 2014, opiate use affected approximately 0.4% of the global population, the equivalent of 17 million people. Hair analysis for drugs is already recognized as an indispensable tool in the fields of forensic and clinical toxicology for monitoring chronic drug use. For this purpose, the aim of the present study is the validation and application of a solid phase extraction (SPE) technique with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis for the simultaneous identification and quantification of the most commonly opiates found in Brazil such as morphine and codeine, in real and reference samples.

Method: To validate the method, drug-free head hair specimens were collected and separated in 50 mg aliquots. Each aliquot has been washed with 2 mL of dichloromethane for 15 min at 37°C. Morphine, codeine and their respective deuterated standards were spiked into the same sample with 3 mL of phosphate buffer 0.1 M at pH 5 and incubated at 45°C for 18 h. Then, the samples were extracted with Bond Elut Certify cartridges, using the method proposed by the manufacturer, with modifications. After extraction, the residue was derivatized with N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide and trimethylchlorosilane (BSTFA +1% TMCS) and analyzed by GC-MS. For application of the method only deuterated standards were added to the real and reference samples.

Results and Discuss: The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.1 ng/mg and 0.2 ng/mg, respectively, for all analytes. The calibration curves were linear over a concentration range of 0.2 ng/mg to 10 ng/mg ($r^2 = 0.99$). No traces of carryover effects have been found. The method showed to be selective, precise and accurate (RSD% < 15%) for all analytes. One real sample yielded a positive result for codeine (0.41 ng/mg) and one reference sample also showed a positive result for morphine (0.81 ng/mg). Analysis of the wash residues were also performed to confirm consumption and to exclude external contamination.

Conclusion: *The validation and application of SPE followed by GC-MS analysis was satisfactory for the simultaneous identification and quantification of morphine and codeine in hair samples. The procedure used for sample incubation showed good stability and recovery of analytes as well as cleaner extracts compared to traditional methods reported in the literature.*

Detección de (-)- Δ^9 -THC en saliva por ELISA (Neogen THC ORAL FLUID KIT).

Dellepiane, L.* Umpiérrez, E.

Unidad de Medio Ambiente, Drogas y Doping-Polo Tecnológico de Pando

Facultad de Química-UdelaR-Montevideo, Uruguay.

* ldellep@fq.edu.uy

Introducción: El 20 de diciembre de 2013, el poder Legislativo Uruguayo aprobó la ley que regula la producción, distribución y venta del cannabis (Ley N°19172). El 6 de mayo del 2014 entró en vigencia el decreto reglamentario de la ley y el 18 de agosto del 2014 el Instituto de Regulación y Control del Cannabis (IRCCA) estableció las especificaciones técnicas que deben cumplir los dispositivos de control de Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (THC), que se utilicen en detección en la conducción y en el área laboral.

A tal efecto el IRCCA, resuelve que se debe utilizar únicamente métodos de detección en saliva que sean reactivos al Δ^9 -THC con un límite de corte de 10ng/mL de Δ^9 -THC en saliva, con menos de 20% de reactividad cruzada con otros cannabinoides o sustancias y que posean sensibilidad y especificidad mayor al 80%. Hasta el momento, sólo uno de los point of care ensayados cumple todos los requisitos del IRCCA, pero el mismo es de alto costo.

El objetivo de este trabajo es comprobar la posibilidad de usar el test de Neogen para Δ^9 -THC en saliva de bajo costo que posee un límite de detección de 1,31ng/mL.

Métodos: Dado que el kit de Neogen tiene un límite de detección mucho menor al cut-off para THC definido para Uruguay, se propuso una dilución 1:8 de la muestra con el fin de hacer que el punto de decisión coincida con el punto de inflexión de la curva de calibración. Las diluciones se realizaron con un buffer especial (NeoSal Buffer) proporcionado por Neogen.

Se obtuvieron muestras de saliva con declaración negativa de consumo y de exposición a cannabis que fueron analizadas para confirmar su negatividad por GC/MS. Las mismas se utilizaron para preparar soluciones aditivadas con estándar certificado de Δ^9 -THC a las concentraciones de 7,5; 10 y 12,5 ng/mL. Las salivas aditivadas fueron diluidas con NeoSal Buffer. Los ensayos se realizaron en días distintos, cada día por duplicado para verificar repetitividad y reproducibilidad.

Conclusiones: *La dilución elegida refleja que el kit utilizado en estas condiciones es confiable y se ajusta al propósito de detectar THC en saliva con un límite de corte de 10ng/mL. La dilución 1:8 logra que el punto de inflexión de la curva de calibración esté cerca del cut-off, la cual es la mejor situación para el uso correcto de un kit ELISA. Por lo tanto se logró verificar una técnica alternativa en saliva que cumple con los requisitos solicitados del IRCCA*

BROMACIL PESTICIDE: DECONTAMINATION PROCEDURE AND QUANTITATIVE DETERMINATION IN HAIR BY LC-MS

Arias-Mora, F.1, Castro-Murillo, M.2, León-Mora, E.2, Masís-Mora, M.3, Reyes-Moreno, L.2, Ureña-Solera, I.1, Leda Giannuzzi 4 and Luis Ferrari 4

1 Departamento de Farmacología, Toxicología y Farmacodependencia. Universidad de Costa Rica, 2 Laboratorio de Ensayos Biol. Univ. De Costa Rica. 3 Centro de Invest. En Contaminación Ambiental. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 4 Toxicología Avanzada y Qca Forense. FCE, Universidad Nacional de La Plata, Argentina E-mail: *freddyariasmora@gmail.com

Keywords: hair, washing, bromacil, pesticide, quantitative analysis by LC-MS

Introduction: Bromacil or 5-bromo-3-sec-butyl-6-methyluracil is a no selective herbicide used for the cultivation of pineapple and control of some citrus. Although it was withdrawn from EU, few years ago, in Costa Rica, continues to be used as one of the main herbicides in pineapple crops. In 2007 the production reached 41,000 hectares (100% increases in three years).

Aims: In this contribution we tried to establish, through animal model, a decontamination technique and quantitative analysis of bromacil in hair, as a marker of chronic exposure to be applied to individuals exposed in growing areas. This is the first report of bromacil in hair as a potential biomarker in the literature

Methods: We administered for three months, orally, in the drinking water of twelve Sprague Dawley rats a bromacil dose of 3.84 mg / kg / day. After decontamination of hair with sodium dodecylsulfate and methanol by 5 min, were segmented (1 cm each) hair sample. Each segment was cut into small pieces (< 1 mm) and 25 mg were sonicated 15 minutes in 1 mL of methanol then incubated 12 hs at 37 °C with 10 ng bromacil-d3 used as internal standard. Samples were centrifuged and the methanol was evaporated and re take with water After a liquid-liquid extraction with ethyl acetate samples the extract was analyzed with Agilent 6130 LC/MS system. Bromacil was identified with the two following ion (m/z): 261.1 and 205.1. The method was validated

Results: Hair segments results (ng/mg) are shown in the following table.

	Female (ng/mg)	Male (ng/mg)
15 days	7,16 ± 3,47	8,65 ± 3,65
30 days	110,46 ± 31,37	54,61 ± 18,09
45 days	33,81 ± 15,4	16,49 ± 6,38

Conclusions: Table shows the amounts of bromacil in hair with increasing exposure, regardless of variations in water consumption. At 45 days there was a decrease that could be due to a lower consumption of water due to prolonged exposure to the pesticide. This preliminary research will allow us to point to the human hair exposed to bromacil.

Desarrollo de una biblioteca de espectros de masas para compuestos de interés en dopaje empleando derivatización con N-metil, N-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA), a través de cromatografía de gases con impacto electrónico (GC-EI/MS)

Daniela Andrea Contreras Pérez¹, Gloria Inés Gallo Isaza², Jorge Ariel Martínez Ramírez^{1*}

¹Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá D.C. A.A. 14490, Bogotá D.C., Colombia.

²Laboratorio de Control al Dopaje - Coldeportes

*Correspondencia: Profesor Jorge Ariel Martínez Ramírez e-mail: jamartinezra@unal.edu.co, Tel: 3165000 Ext. 14628.

Bogotá D.C.-Colombia. Av. Carrera 30 # 45-03. Cód. Postal 111321. Edificio 450. Bogotá D.C., Colombia

Palabras claves: biblioteca, espectro masas, MSTFA, GC-EI/MS

Introducción: La lista de sustancias prohibidas publicada oficialmente por WADA (Agencia Mundial Antidopaje) contiene diferentes compuestos los cuales se encuentran en muy bajas concentraciones en las matrices biológicas a analizar. Además de su baja concentración, algunas de estas sustancias tienen en su estructura grupos funcionales polares que hace obligatorio un proceso pre-analítico de derivatización. Bases de datos comerciales específicas para estos compuestos derivatizados no está disponible en el Laboratorio de Control al Dopaje donde se utilizan librerías como NIST, MPW y WILEY275, razón por la cual el objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de una librería in situ con sustancias incluidas en la lista WADA empleando como agente derivatizante N-metil, N-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA) y posterior análisis con GC-EI/MS.

Métodos: En tubo seco de 10 mL fueron colocados 12,5 µL de una solución en metanol de los diferentes analitos algunos en forma separada y otros en mezcla y llevados a sequedad con atmósfera de N₂. Posteriormente los analitos fueron derivatizados con 50 µL N-metil, N-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA) a 65°C por 30 min y 2 µL del derivado fue inyectado en el GC-EI/MS bajo las siguientes condiciones: columna: ULTRA 1, metil-silicona (25m x 0,2mm x 0,11µm), split (1:10, 280°C), horno 190 °C hasta 235 °C a 2 °C/min y luego hasta 300 °C a 15°C/min por 5 min. Fuente de ionización y cuadrupolo a 230°C y 150°C respectivamente. Rango de escaneo 70 a 650 u.m.a.

Resultados y discusión: La librería incluyó 81 sustancias, de las cuales 55 pertenecen al grupo S1 (Agentes anabólicos) de la lista WADA, 5 al grupo S3 (Agonistas β₂), 5 al grupo S4 (Hormonas y moduladores metabólicos), 3 al grupo S5 (Diuréticos y agentes enmascarantes), 2 al grupo S6 (Estimulantes), 9 al grupo S7 (Narcóticos), 1 al grupo S8 (Cannabinoides) y 1 perteneciente al método prohibido M1 (Manipulación de sangre y componentes sanguíneos). Todas las entradas fueron llevadas a cabo seleccionando el ápice del pico, con limpieza del espectro, incluyendo el ion molecular, el pico base y dos picos más, característicos de la fragmentación. Previo a la inyección de los estándares y al inicio del día se realizó una sintonización (AutoTune) con perfluorobutilamina (PFTBA).

Conclusión: Se creó una librería de compuestos de interés en dopaje con 81 espectros de masas para la correcta identificación de sustancias prohibidas en el deporte, analizadas principalmente en muestras biológicas, las cuales no están disponibles en las librerías tradicionales empleadas en nuestro laboratorio.

ABORDAJE DE CASOS RELACIONADOS CON NUEVAS SUSTANCIAS PSICOATIVAS (NSP)

David Hernández, Johanna Dallos. Grupo de Estupefacientes, Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses – Regional Bogotá.

Introducción: La aparición de las denominadas Nuevas Sustancias Psicoactivas (SPA) son un hecho en las estadísticas forenses del análisis de sustancias incautadas a nivel mundial, siendo ésta la mayor amenaza relacionada a todos los problemas relacionados con el narcotráfico actual. En Colombia la mayoría de NSPA son de origen sintético, estando éste fenómeno mayormente asociado al uso de estos derivados como sucedáneos de drogas psicoactivas de uso tradicional (LSD, MDMA, Marihuana, Mefedrona).

Objetivo Desarrollar una metodología analítica que permita determinar el abordaje de casos relacionados con Nuevas Sustancias Psicoactivas (NSP), utilizando pruebas de identificación preliminar homologadas (PIPH) y prueba confirmatorio, cromatografía de gases acoplada a masas.

Materiales y métodos: Sustancias de referencia representantes de cada grupo de NSP: JWH-073, m-CPP, 2CE, DOI, LSD, Mefedrona, DOB, Ketamina, PMMA, 2CB, Mescalina, Fenciclidina y PMA.

Sustancias debidamente caracterizadas con las que no se cuenta patrón de referencia: Yagé (DMT, Harmina y Harmalina), Metilona, 6-APB, 25-I-NBOMe, DOC y 25-C-NBOMe.

Etanol, metanol y solventes adecuados para solubilizar y extraer las sustancias en mención.

Solución de tetracosano de 1000mg/L como estándar interno. Reactivos para reacciones preliminares (orientativas): Marquis, Dragendorff, Simmon's, Liebermann's, Mandelin's, p-dimetilaminobenzaldehído, Mecke's.

Cromatógrafo de gases con detector de masas, Marca Thermo Scientific, Modelo: Trace 1300/ISQ, Serial 713100018. Cromatógrafo de gases con detector de Masas, Marca: Agilent Technologies, Modelo: 6890N/5973N Serial: US10139069.

Resultados y discusión: El abordaje de casos relacionados con NSP representan un nuevo hito para los laboratorios de ciencias forenses encargados del análisis de drogas incautadas, por tanto, es de suma importancia generar una metodología que permita su adecuado manejo. Para ellos se realiza una separación y descripción detallada del material incautado. Posteriormente, si la cantidad lo permite, se realiza un screening de pruebas preliminares y posteriormente se analiza con una técnica cromatográfica adecuada, que permita una buena resolución entre sustancias mezcladas, para garantizar así su identificación sin que ninguna quede excluida. En el laboratorio se creó una metodología que permite la óptima separación de las sustancias mencionadas en el parágrafo de materiales y métodos.

Casos Forenses: Se han identificado casos de LSD adulterados con sustancias de las series 25-XNBOMe, y DOX, así como casos de tabletas simulando MDMA que contiene metilona y 6APB, entre otros.

Conclusión: Se creó una metodología cromatográfica adecuado para la separación de un buen número de sustancias representativas de los diferentes grupos de NSP, así como una propuesta de abordaje de los casos.

Estudio del metabolismo in vitro de Metilona (3,4-metilendioximetcatinona) por hongos del género *Cunninghamella*

Eliana Andrea Silva Páez^{1,2} Jorge Ariel Martínez Ramírez^{1*}
1Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá D.C. A.A. 14490, Bogotá D.C., Colombia.

2Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Grupo de Estupefacientes, Regional Bogotá.

*Correspondencia: Profesor Jorge Ariel Martínez Ramírez
e-mail: jamartinezra@unal.edu.co

Teléfono: +(01157-1) 3165000. Ext 14628

Palabras Clave: Metilona, GC-MS. *Cunninghamella elegans*, Metabolismo

Introducción: La metilona es uno de los derivados sintéticos de catinona, que se comercializa como "sal de baño" y que hoy en día se emplea como droga de abuso. El desarrollo de modelos que permitan conocer su metabolismo en humanos y el diseño de metodologías analíticas modernas para su detección es actualmente objeto de investigación. En la búsqueda de este objetivo se han empleado modelos in vitro (microsomas hepáticos), in vivo (animales) u orina de consumidores. Estos modelos presentan algunas limitaciones en cuanto a metabolismo incompleto, tiempos de incubación prolongados y dificultad en la consecución de matrices biológicas. Esta investigación desarrolla un modelo in vitro alternativo para el estudio del metabolismo de metilona, a partir del hongo *Cunninghamella elegans* empleando GC-EI/MS.

Métodos: En matraz de 100 mL con 20 mL de caldo PDA fué inoculado un asa de esporas (0,998 x 10⁶ esporas) de *C. elegans*. Los cultivos se incubaron por 5 días a 27°C y 60 rpm. Luego se adicionaron 2 mL 1 mM de metilona y después de 5 días de biotransformación, 750 µL del sobrenadante se extrajeron con 500 µL de acetato de etilo:isopropanol:diclorometano (60:20:20, v/v/v). El sobrenadante se evaporó en atmósfera de nitrógeno y se reconstituyó con 50 µL de metanol y 2 µL de extracto fueron introducidos en el GC-EI/MS bajo las siguientes condiciones: Columna: HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), split (25:1, 250°C), rampa de temperatura 100 °C por 2,5 min, hasta 230 °C a 25°C/min por 1 min. Luego aumentó a 290°C a 35°C/min por 9 min. Fuente de ionización y cuadrupolo a 230°C y 150°C respectivamente.

Resultados y discusión: Cuatro metabolitos fueron identificados en GC-EI/MS. El primero corresponde al metabolito N-acetil-3,4-metilendioxicatinona (MDC), generado por la N-demetilación de la metilona, metabolito previamente reportado por Kamata et al. 2006 en orina humana. Además se detectó también α-hidroxi-3,4-metilendioxiifenil-2-propanona como resultado de la pérdida del grupo amino seguida por la hidroxilación en la posición 2 de la cadena principal. La posterior oxidación del grupo hidroxilo en esta molécula genera el metabolito 1,2-propanodiona 1-(3,4-metilendioxiifenil). Finalmente, el metabolito N-acetil-3,4-metilendioximetcatinona se produce mediante la N-acetilación de la metilona.

Conclusiones: El modelo in vitro propuesto, permitió la identificación rápida y sencilla del metabolito mamífero MDC. Adicionalmente se detectaron otras tres moléculas que hasta el momento no han sido reportados en literatura. Dichas estructuras deben ser confirmadas por técnicas analíticas como LC-MS/MS y RMN.

Acute intoxication after alternative natural therapy for depression

Rafael Lanaro¹, Damila R. de Morais², Vinicius V. Hernandez², Elias. P. Tessaro², Deleon N. Correa², Cezar S. Gomes³, Marcos N. Eberlin², Jose Luiz Costa^{1,4}

1. Poison Control Center, University of Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brazil

2. ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, University of Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brazil

3. Brazilian Federal Police, Natal-RN, Brazil

4. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brazil

Introduction: Alternative health treatments using substances or procedures not scientifically proven, has been used by patients suffering from serious diseases, diseases where there is no effective medical treatment or those that have poor or no response to established medical treatments. How often are performed without medical monitoring and often use poorly studied substances, these treatments can cause poisoning and other risks to the health of the patient. The term Ayahuasca is used to refer to decoctions of the liana *Banisteriopsis caapi* plus *Psychotria viridis*. This beverage, used originally in religious ceremonies, has significant concentration of active substances. The term Kambo refers to a purification ritual, performed mostly at amazon region, where the secretion (named 'Kambo vaccine' or 'frog vaccine') collected from the skin of the frog *Phyllomedusa bicolor* is applied into the skin of the patient. In the present work, we report an acute intoxication episode after simultaneous submission to Ayahuasca and Kambo treatment.

Method: A 37 year-old woman was admitted to emergency service (ES) with visual hallucination, agitation, tremors of extremities, oral paresthesia, skin lesions and seizures. It was reported that she was submitted to an 'alternative treatment for depression', where she ingested approximately 100mL of Ayahuasca and received five subcutaneous applications of Kambo. Diazepam was administered by ES and was effective to control the hallucination, but wasn't to agitation and seizures. The patient was asymptomatic after 6 hours and discharged 24h without any sequel.

Patient samples (urine, serum) and also the used materials where submitted to toxicological analysis, using liquid/liquid extraction, GC-MS and LC-MS/MS.

Results: In patient's sample, it was detected N,N-dimethyltryptamine (32 ng/mL serum, 4877 ng/mL urine), harmine (123 ng/mL serum, 606 ng/mL urine), harmaline (0.3 ng/mL serum, 494 ng/mL urine) and tetrahydroharmine (182.2 ng/mL serum, 567.4 ng/mL urine). No other drug of abuse or pharmaceutical (except diazepam) was detected in general unknown screening. In Ayahuasca, it was detected N,N-dimethyltryptamine, harmine, harmaline and tetrahydroharmine at concentrations of 678, 597, 132 and 1235 mg/L, respectively. High-resolution mass spectrometry analysis performed in Kambo sample detected the presence of two abundant peak, identified as the active peptides phyllomedusin and phyllocaerulein.

Conclusions *The symptoms presented by the patient seem to have been produced by the joint action of the two materials. The use of alternative therapies is becoming more common, but the indiscriminate use of substances and materials have not been adequately studied can worsen the health condition of the patient.*

IDENTIFICACION DE 2,5-DIMETOXY-4-METILANFETAMINA (DOM) Y METABOLITOS EN ORINA HUMANA POR GC/MS.

Autores: Insaurralde, M.; Martínez E.; Cubilla C.; Díaz Gill, R. Laboratorio de Toxicología-Díaz Gill Medicina Laboratorial S.A.

toxiforens@diazgill.com.py

marizain@gmail.com

Asunción-Paraguay

Introducción: 2,5-Dimetoxi-4-metilanfetamina (DOM) es una feniletilamina psicodélica, con propiedades alucinógenas, sintetizada por primera vez por Alexander Shulgin en 1963 y distribuido en las calles como STP (Serenidad, Tranquilidad y Paz). En el mercado negro se comercializan en cápsulas o pastillas de cualquier forma, tamaño y color, se administra por vía oral, sublingual (impregnados en papel), las dosis varían de 3 a 10 mg y los efectos pueden durar entre 14 y 20 horas. Estudios científicos en humanos relacionados a la farmacología y toxicología de estas sustancias son limitados, así como también la disponibilidad de estándares de referencia y métodos analíticos para detectarlos por ser compuestos con estructura química modificada.

Objetivo: Identificar 2,5-Dimetoxi-4-metilanfetamina y metabolitos en orina humana por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masa (GC/MS).

Materiales y métodos: La investigación basada en el análisis de orina de una persona sospechosa de consumir alguna droga. Se utilizó 5mL de orina, hidrolizada con 1mL de ácido clorhídrico 10N, calentado a 90° C por una hora. Se enfrió, alcalinizó y se realizó la extracción líquido-líquido en medio básico con la mezcla de solventes Heptano-Isopropanol-Diclorometano-Dicloroetano, se evaporó la fase orgánica, se derivatizó acetilando con anhídrido acético/piridina (10:1) a 60°C por 30 minutos, secado y reconstituido con 100 µL de acetato de etilo e inyectado en el GC/MS. Se utilizó un Cromatógrafo de Gases 7890A acoplado a Espectrómetro de Masa 5977A; columna HP-5MS (30m x 250µm x 0.25µm); inyector: 280 °C; gas carrier helio; temperatura de horno 100°C aumentando 10°C/minuto hasta 300°C, permaneciendo a ésta temperatura por 15 minutos; modo de ionización: impacto electrónico (EI), 70 eV, full SCAN, m/z 40-600 u.

Resultados y discusión: Usando AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System) con las bibliotecas de espectros MPW2007, NIST11 se identificaron: 2,5-Dimetoxi-4-metilanfetamina (DOM 2AC); el metabolito hidroxilado DOM-M (OH-) 2AC; DOM precursor-2 2AC; DOM-intermedio(2,5-dimetoxitolueno); iones seleccionados: 192,251,165; 250,309,86; 124,166,208 y 137,152,109 respectivamente. Publicaciones científicas sobre estudios realizados con DOM en animales de experimentación reportan hallazgos de DOM y el metabolito hidroxilado DOM-M (OH-), identificados en la orina humana analizada, pero no detectamos el metabolito hidroxilado deamino-oxo, encontrado en animales. Sin embargo se encontraron otros compuestos que probablemente provienen del proceso de síntesis de estas drogas de diseño.

Conclusión: *La investigación permite contar con una metodología analítica para la identificación de DOM y metabolitos en orina humana, hasta ahora no realizados en nuestro país.*

Identificación de plaguicidas mediante extracción en fase sólida dispersiva, en casos de muerte por intoxicación

Autora: Andrea Milena Bernal Rey, Grupo de Toxicología, Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses – Bogotá (Colombia)

Introducción: En Colombia, en los últimos años ha habido un aumento en el uso de sustancias plaguicidas para el control de plagas en los diferentes cultivos. La concepción popular es que entre más cantidad se adicione mayor efecto, lo cual aunado a las malas prácticas agrícolas, ha llevado a un uso exagerado de estos productos en su aplicación agrícola. Esta abundancia de plaguicidas ha contribuido al uso de esta sustancia como agente con fines suicidas y intoxicaciones accidentales en la población campesina. La mayor dificultad mayor en la determinación de plaguicidas en muestras de interés forense es su liposolubilidad ya que se disuelven en los lípidos de la sangre como del contenido gástrico, produciendo una gran interferencia en los análisis tanto para su separación, como por la sensibilidad ya que el espectrómetro de masas se ensucia, a esto se une la inestabilidad que presentan estas sustancias en medios alcalinos o ácidos, dificultando aún más su determinación en dichas matrices.

Objetivo: Presentar una metodología desarrollada por el laboratorio de toxicología del Instituto Nacional de medicina legal y Ciencias Forenses para la extracción neutra de plaguicidas en muestras forenses biológicas y no biológicas utilizando para análisis la cromatografía de gases con espectrometría de masas con back-flush

Materiales Y métodos:

Sales de extracción: sulfato de magnesio y acetato de sodio

Sales de limpieza: sulfato de magnesio y silica

Solventes: Acetonitrilo, agua y acetato de etilo.

Límite de detección 0.2 µg /mL,

columna DB-5,

Horno entre 80°C y 290°C

Equipo CG-MS Agilent 7890

Resultados y Discusión: Cumpliendo su misión el laboratorio de toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses ha desarrollado una metodología similar al método "Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe" (QuEChERS) ("rápido fácil barato resistente eficaz y seguro" utilizado por la industria para los alimentos; pero adaptado al área forense, utilizando como técnica para análisis la cromatografía de gases con espectrometría de masas con back-flush. Tanto la extracción con QuEChERS como la adaptación de back-flush contribuyen a preservar la columna y detector ya que entre los dos se elimina gran parte de la grasa que acompaña la muestra mejorando la identificación de los plaguicidas.

Casos forenses:

A-Hombre adulto de 37 años encontrado sin vida en vía carreteable, cerca de una finca con cultivos y sin causa evidente de muerte. La manera de muerte indeterminada. Presenta una alcoholemia de 80 mg%. Plaguicida encontrado en sangre y

contenido gástrico Metamidofos.

B-hombre adulto de 53 años encontrado sin vida en su casa de habitación con secreción espumosa por boca y nariz. Sin causa evidente de muerte. La manera de muerte indeterminada. Presenta una alcoholemia de 217 mg%. Plaguicida encontrado en sangre y contenido Carbofuran.

C-Hombre adulto, posible intoxicación o envenenamiento por sobredosis de psicoactivos, al parecer ingirió varios medicamentos ácido acetil salicílico, fenobarbital, gemfibrosil. Encontrado en estado de descomposición. Solo se recibe contenido gástrico. Se encontró en contenido gástrico ácido valproico y gemfibrosil

Bibliografía: 5.1. Procedimiento estandarizado de trabajo DG-M-PET- 106.

Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses- Colombia

5.2. Shuntaro M. et. All . Development of a simple one-pot extraction method for various drug and

metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS. Forensic Science Internacional 232(2013) 40- 45

5.3 QuEChERS Sample Preparation Approach for Mass Spectrometric Analysis of Pesticide Residues in Foods

"METALES PESADOS (ARSÉNICO, PLOMO Y CADMIO) EN AGUA DE CONSUMO Y SU PRESENCIA EN SANGRE EN POBLADORES DEL DISTRITO DE COATA.ENERO-MARZO DEL 2016"

"HEAVY METALS (ARSENIC, LEAD AND CADMIUM) IN DRINKING WATER AND ITS PRESENCE IN BLOOD IN THE SETTLERS COATA DISTRICT, JANUARY-MARCH 2016"

Loayza María Reyes Rossana Carbajal Juan Huarachi Abel Quispe Roxana

Introducción: Los metales pesados son una preocupación importante para la salud pública por su toxicidad aguda, vía alimentaria principalmente, se encuentran el plomo, cadmio y arsénico; por ello la investigación tuvo como objetivo principal, determinar las concentraciones de éstos metales pesados en agua de consumo y en sangre de pobladores del distrito de Coata - Puno - Perú en Enero –marzo 2016.

Métodos: El presente estudio fue tipo: transversal, analítico y descriptivo. La población estuvo constituida por 14 muestras de la cuenca del río y pobladores que viven alrededor de la cuenca del río del distrito de Coata. Para el análisis de las muestras se utilizó el método espectrofotometría de absorción atómica para determinar las concentraciones de los metales pesados.

Resultados y Discusión: En las muestras de agua de encontró un promedio de arsénico en agua de 0.067mg/l, cadmio de 0.00204mg/l, y plomo de 0.000142mg/l, siendo solo el arsénico el que supera los valores establecidos según la ECA (Estándares Nacionales de Calidad). En el análisis de sangre los valores promedio del arsénico fue 0.419ug/l en el cual no supera los valores normales fijado según la OMS (Organización Mundial de la Salud), cadmio de 0.174ug/l el cual no supera los valores normales y con el plomo se obtuvo un promedio de 0.209ug/l encontrándose por debajo de los valores normales emitidos según la OMS. Para la relación de la presencia metales pesados (Arsénico, cadmio y plomo) en agua de consumo y su presencia en sangre, al realizar el análisis estadístico; "correlación de Pearson", nos dio a comprobar que no existe relación entre ambas variables. Conclusiones: No existe relación entre el agua de consumo y las concentraciones de metales (arsénico, plomo, cadmio) en sangre de los pobladores del distrito de Coata.

"Fatal case by use of Ketamine"

Q.F. Nancy Fuentes Barriga.
Toxicology Unit - Department of Laboratory- Legal Medical
Service, Santiago-Chile
Keywords: Ketamine, Norketamine, GC-NPD

Introduction: Ketamine is general anesthetic, fast distribution into tissues, including the brain by administration parenteral. It produces, hallucinogenic effects similar to phencyclidine and can be used as drug abuse. Its action starts quickly when intramuscularly or intravenously administered, reaching its peak plasma concentration at 10 min. Ketamine consumers suffering from a dissociative state, with the feeling of floating giving rise to hallucinatory experiences, and delusions.

Method: According to background information provided by the police, 'death veterinarian within his consultation', analysis of drugs of abuse and drugs is made for which samples of whole blood and urine samples were used to perform screening of drugs of abuse and drugs through immunosorbent chemiluminescence system "Evidence Investigator Randox" and immunoassay method Acon respectively. Thereafter whole blood is performed in liquid-liquid extraction with organic solvent, controlled pH and subsequent detection of the extract by gas chromatography (GC) with NPD detector (Agilent 7890-A), Zebron column (50m x 0.20mm x 0.33 um) using the An-phetamine method; this analysis was performed with internal standard bupivacaine (40 ug / mL) and Cerilliant standards for ketamine and norketamine (40ug / mL) respectively.

The BAC was performed in duplicate by gas chromatography with head-space system (GC-HS-Perkin Elmer- Clarus - 500) and double column with FID detector (LOD = 0.002 g / L, LOQ = 0.02 g / L).

Results:

BAC = 0.00 g / L

[Ketamine]_{sa} = 6.75 ug / mL

[Norketamine]_{sa} = 4.92 ug / mL

Norketamine has about one sixth of the potency of ketamine.

Conclusions: *The victim of veterinary profession was detected, the presence of ketamine and norketamine (active metabolite of ketamine) blood in toxic-lethal amounts, without alcohol.*

The method presented is simple, specific, sensitive, and reproducible.

The results are consistent with histological examination, hypoxia, congestion and edema with microhaemorrhages the brain, lungs intra-alveolar edema with severe congestion vascular, subendocardial hypoxia at heart level. Ketamine produces stimulating effects on the cardiovascular system, causing tachycardia, increased blood pressure and oxygen consumption myocardial.

Validación de una metodología analítica para la determinación de benzodiazepinas en matrices biológicas forenses por extracción QuEChERS y LC/MS/MS

Dra. María de los Ángeles Sancho Brenes¹
1Sección de Toxicología, Departamento de Ciencias
Forenses, Costa Rica.

Introducción: Las benzodiazepinas son un grupo de compuestos psicoactivos conocidos por sus propiedades sedantes, hipnóticas y anticonvulsivantes, que están entre las drogas más comúnmente prescritas en Costa Rica y en otros países para la ansiedad, desórdenes del sueño, agitación, espasmos musculares y síndrome de abstinencia al alcohol. Esta situación incrementa su potencial para adicción y abuso, razón por la cual estos compuestos están asociados con el mal uso. Las benzodiazepinas están implicadas en casos de abuso sexual, robos, intentos suicidas, homicidios y accidentes de tránsito; consecuentemente, son encontradas con mucha frecuencia en casos toxicológicos clínicos y forenses.

En este trabajo se presenta la validación de una metodología para el análisis de las diez benzodiazepinas más frecuentemente encontradas en los análisis de muestras de sangre y orina de los casos que ingresan en la Sección de Toxicología del Departamento de Ciencias Forenses. Las benzodiazepinas analizadas son las que se detallan a continuación: oxacepam, temazepam, nordiazepam, diazepam, midazolam, alprazolam, hidroxialprazolam, lorazepam, 7-aminoclonazepam y clonazepam.

Para la preparación de las muestras de sangre y orina se requieren al menos 2 mL de muestra conservada con fluoruro de sodio. Las muestras de orina se hidrolizan enzimáticamente con B-glucuronidasa, previo a la extracción utilizada.

La extracción utilizada consiste en una modificación a la técnica de QuEChERS por sus siglas en inglés (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged). La técnica de extracción QuEChERS está compuesta esencialmente de 2 etapas: 1) extracción / partición y 2) extracción en fase sólida de dispersión (d-SPE). La identificación y confirmación de las benzodiazepinas se realiza mediante análisis en el equipo LC/MS LTQ XL. Esta metodología utiliza la interfase de Ionización por Electro-spray, con polaridad positiva. El equipo LTQ XL utilizado tiene un analizador de masas de trampa de iones lineal con detector dual, por lo tanto tiene la capacidad de realizar experimentos MS/MS y MSn con buena sensibilidad.

Reactivos y materiales: Metanol y acetonitrilo calidad HPLC o LC/MS. Agua tipo I (Milli Q). Ácido fórmico calidad HPLC o LC/MS. Formato de Amonio calidad HPLC LC/MS. Cilindro de Helio UAP y Gas nitrógeno en cilindro, grado industrial. Enzima B-glucuronidasa de Helix pomatia >100000 Unidades/mL, Sigma-Aldrich. Tubos con sales de QuEChERS (original), cloruro de sodio/sulfato de magnesio Agilent 5982-5555. Microtubos de limpieza para SPE dispersivo Agilent 5982-5121. Soluciones madres de 1 mg/mL de benzodiazepinas y análogos deuterados diazepam D5 y clonazepam D4, marca cerilliant con pureza mayor al 99%, solución madre de 250 ug/mL de Multi-componente de Benzodiazepinas (8 analitos) marca cerilliant (oxacepam, nitrazepam, alprazolam, lorazepam, clonazepam, temazepam, flunitrazepam y diazepam). homogenizadores de cerámica Agilent 5982-9312, filtro de jeringa de nylon o teflón de 0.22 µm.

Matrices para las pruebas: Sangre de caballo donada por el

Instituto Clodomiro Picado y muestras de orina libre de benzodiazepinas.

Equipo: Cromatógrafo líquido Thermo Scientific, con bomba Accela 600 S/N 920813 con desgasificador por vacío en línea, Automuestreador Accela AS, S/N 751092 con compartimiento con temperatura controlada para la columna, detector de masas por trampa de iones LTQ XL S/N 21465. Controlado por una computadora capaz de correr los programas "LTQ Tune Plus" versión 2.6 y "Xcalibur" versión 2.1. Columna Kinetex 2.6u C8 100A, tamaño 100 x 4.6 mm, marca phenomenex.

Método cromatográfico: Flujo de columna: 500 uL/min, Tiempo de corrida: 11 min, Fase móvil (FM): 30% (Acetonitrilo 0.1 % ac. fórmico), 70% (Buffer 10 mM formato amonio, 0.1 % ac. fórmico). Volumen de inyección: 10 µL. Pretratamiento de las muestras de orina: Las muestras de orina (2 mL) se mezclaron con 10 uL de los estándares internos y 100 uL de buffer de acetato de sodio 2M, de pH 4.5, y fueron incubadas con 100 uL de la enzima B-glucuronidasa de Helix pomatia, en baño maría a 56°C durante 2 horas.

Extracción de muestras: Se utilizó 2mL de muestra enriquecida con un mix de las benzodiazepinas evaluadas y se agregaron los estándares internos, se colocó un homogenizador de cerámica, se aplicó vortex por un minuto, y se agregaron 2 mL de acetonitrilo y 1g de las sales de QuEChERS original (MgSO₄ y NaCl). Se agitó vigorosamente con el antebrazo por 1 minuto. Se centrifugó a 5000 rpm por 15 min. Se depositó 1 mL de la parte superior del extracto en el tubo de limpieza con PSA/C18 y MgSO₄. Se aplicó vortex por 1 min. Se centrifugó a 9000 rpm por 6 min. Se transfirió 500 uL del sobrenadante a un tubo de 5 mL, el cual fue secado en sistema de evaporación con nitrógeno y se reconstituyó con 200 uL de la fase móvil (70/30: buffer/acetoneitrilo). La filtración de las muestras se realizó con jeringa con filtro de nylon o teflón de 0,22 µm.

Resultados y Discusión:

Los analitos fueron identificados en modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) usando dos o más transiciones. Los estándares internos utilizados son clonazepam D4 y Diazepam D5. A continuación se muestran los resultados:

ANALITO	Energía de colisión CID	ION precursor M+H	ION producto principal m/z	ION producto	ION producto
Oxazepam	22	287	269	241	
Midazolam	35	326	291	244	285
Temazepam	18	301	283	255	
Diazepam	39	285	257	154	222
Alprazolam	38	309	274	241	281
Clonazepam	40	316	270	251	288
Lorazepam	17	321	303	275	
Nordiazepam	45	271	243	140	
7-aminoclonazepam	33	286	250	222	
Hidroxyalprazolam	35	325	307	279	
Clonazepam D4	40	320	274	255	
Diazepam D5	39	290	262		

En la validación de esta metodología se obtuvieron los siguientes parámetros de desempeño analítico:

Límite de detección: El límite de detección fue obtenido mediante curvas de calibración en sangre y en orina con 5 niveles y 5 réplicas por nivel. Todas las benzodiazepinas analizadas presentaron límites de detección iguales o inferiores a 10 ng/mL en sangre y a 20 ng/mL en orina.

Variación en el Tiempo de retención relativo: Se analizaron dos niveles de concentración y 10 réplicas en cada nivel tanto sangre como en orina hidrolizada. La desviación estándar relativa (RSD%) en el tiempo de retención relativo fue menor a 0,60 % para todos los analitos.

Respuestas relativas de los iones: Se analizaron dos niveles de concentración y 10 réplicas en cada nivel tanto sangre como en orina hidrolizada. La desviación estándar relativa (RSD%) en la respuesta relativa de los iones producto principales fue menor a 20% para todos los analitos en sangre y a 25% para todos los analitos en orina.

Especificidad y selectividad: Todos los analitos cumplieron los criterios de identificación inequívoca en presencias de los siguientes interferentes: benzoilecgonina, cocaína, cocaetileno, carboxy-delta-9-THC, hidroxyl-delta-9-THC, delta-9-THC, morfina, codeína, monoacetilmorfina, cafeína, ketamina, lidocaína, procaína, EDDP, metadona. Además en cada uno de los análisis de muestras de rutina, se evaluó un control multicomponente de benzodiazepinas para verificar la identificación correcta de los analitos.

Tolerancias permitidas en la abundancia relativa de los iones: Todos los iones producto con una abundancia relativa mayor al 10% respecto al pico base, cumplieron con los rangos de tolerancia máximos permitidos por la Agencia Internacional de Antidopaje (WADA).

En esta metodología se utiliza la interfase ESI que presentó buena sensibilidad para los bajos niveles de detección que se requieren en las muestras forenses. Todas las benzodiazepinas se ionizaron con polaridad positiva. El poco tiempo de corrida es posible gracias al uso de la columna C8 que es suficientemente retentiva aún para compuestos polares. Se utilizaron estándares internos deuterados para tratar de compensar el efecto de ión supresión observado en análisis en equipos LC/MS/MS.

Conclusión: Se ha desarrollado un método robusto y específico para la detección de bajos niveles de concentración de diez de las benzodiazepinas y metabolitos más frecuentemente encontradas en muestras de sangre y orina de interés forense, combinando la extracción QuEChERS y LC/MS/MS mediante el uso de un Cromatógrafo líquido Thermo Scientific con trampa de iones. Ha sido validado con resultados satisfactorios en cuanto a límite de detección, selectividad, especificidad y repetibilidad. Esta metodología se utiliza de forma rutinaria en nuestro laboratorio a partir del año 2015 y representa un avance significativo en cuanto a sensibilidad y eficiencia de los análisis de rutina al reemplazar métodos como la extracción en fase sólida y HPLC utilizados anteriormente. Es importante destacar que en este método las intensidades de los iones productos cumplen con los rangos establecidos en la literatura con respecto a las transiciones primarias o precursoras.

Referencias: Wada Project Team. Document number TD2010IDCR, Setiembre 1, 2010.

Westland J, Dorman F. QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2013.

Naciones Unidas. Métodos Recomendados para la detección y ensayo de barbitúricos y benzodiazepinas en Especímenes Biológicos. Manual para uso de los laboratorios nacionales de ensayo de drogas. Manual ST/NAR/28, Nueva York: 1997.

Recommended Maximum Detection Limits for common DFSA drugs and metabolites in urine samples, Drug-Facilitated Sexual Assault Committee, Society of Forensic Toxicologists (SOFT).

María Antonia Martínez González, Revista Española de Medicina Legal, Criterios Cualitativos en Toxicología Forense, 2012.

Usui K, Hayashizaki Y, Hashiyada M, Funayama M. Rapid Drug Extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method. *Legal Medicine* 14(2012).

Rivera H. and Walker S. Analysis of Benzodiazepines in Blood by LC/MS/MS. Agilent Technologies, Inc. 2006.

Laloup M, Ramirez M. et al. Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the simultaneous determination of 26 Benzodiazepines and Metabolites, Zolpidem and Zopiclone, in blood, urine and hair. *Journal of Analytical Toxicology*, Col. 29, october 2005.

Detección de (-) Δ 9-THC en saliva por ELISA (Neogen THC ORAL FLUID KIT)

Dellepiane, L.* Umpiérrez, E.
Unidad de Medio Ambiente, Drogas y Doping-Polo Tecnológico de Pando
Facultad de Química-UdelaR-Montevideo, Uruguay.
* ldellep@fq.edu.uy

Introducción: El 20 de diciembre de 2013, el poder Legislativo Uruguayo aprobó la ley que regula la producción, distribución y venta del cannabis (Ley N°19172). El 6 de mayo del 2014 entró en vigencia el decreto reglamentario de la ley y el 18 de agosto del 2014 el Instituto de Regulación y Control del Cannabis (IRCCA) estableció las especificaciones técnicas que deben cumplir los dispositivos de control de Δ 9-Tetrahidrocannabinol (THC), que se utilicen en detección en la conducción y en el área laboral.

A tal efecto el IRCCA, resuelve que se debe utilizar únicamente métodos de detección en saliva que sean reactivos al Δ 9-THC con un límite de corte de 10ng/mL de Δ 9-THC en saliva, con menos de 20% de reactividad cruzada con otros cannabinoides o sustancias y que posean sensibilidad y especificidad mayor al 80%. Hasta el momento, sólo uno de los point of care ensayados cumple todos los requisitos del IRCCA, pero el mismo es de alto costo.

El objetivo de este trabajo es comprobar la posibilidad de usar el test de Neogen para Δ 9-THC en saliva de bajo costo que posee un límite de detección de 1,31ng/mL.

Métodos:

Dado que el kit de Neogen tiene un límite de detección mucho menor al cut-off para THC definido para Uruguay, se propuso una dilución 1:8 de la muestra con el fin de hacer que el punto de decisión coincida con el punto de inflexión de la curva de calibración. Las diluciones se realizaron con un buffer especial (NeoSal Buffer) proporcionado por Neogen.

Se obtuvieron muestras de saliva con declaración negativa de consumo y de exposición a cannabis que fueron analizadas para confirmar su negatividad por GC/MS. Las mismas se utilizaron para preparar soluciones aditivadas con estándar certificado de Δ 9-THC a las concentraciones de 7,5, 10 y 12,5 ng/mL. Las salivas aditivadas fueron diluidas con NeoSal Buffer.

Los ensayos se realizaron en días distintos, cada día por duplicado para verificar repetitividad y reproducibilidad.

Conclusiones: *La dilución elegida refleja que el kit utilizado en estas condiciones es confiable y se ajusta al propósito de detectar THC en saliva con un límite de corte de 10ng/mL. La dilución 1:8 logra que el punto de inflexión de la curva de calibración esté cerca del cut-off, la cual es la mejor situación para el uso correcto de un kit ELISA. Por lo tanto se logró verificar una técnica alternativa en saliva que cumple con los requisitos solicitados del IRCCA*