



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**Validación del método de inmunoensayo enzimático EMIT para la
identificación de drogas de abuso (tetrahidrocannabinol, cocaína
benzodiazepinas y anfetaminas) en sangre.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

JOEL EDUARDO LEÓN HERNÁNDEZ

ASESOR ACADÉMICO

Dr. ARACELI AMAYA CHÁVEZ

ASESOR EXTERNO

Q. PEDRO ANTONIO GAMBOA CHIGORA

Julio 2020

La siguiente investigación se realizó en la Fiscalía General de Justicia del Estado de México, Coordinación General de Servicios Periciales, Departamento de Toxicología Forense. Bajo la dirección de la Dra. Araceli Amaya Chávez y con el apoyo del Perito Químico Pedro Antonio Gamboa Chigora como asesor externo.

ÍNDICE

RESUMEN	5
ÍNDICE TABLAS	7
ÍNDICE FIGURAS	7
1. MARCO TEÓRICO.....	9
1.1. Epidemiología.	11
1.2. Mortalidad asociada.	12
1.3 Drogas de abuso.....	12
Cannabis (Tetrahydrocannabinol).	13
Cocaína.....	17
Benzodiazepinas.....	23
Anfetaminas.	29
1.4. Pruebas de identificación.	35
1.5. Inmunoensayo.....	35
1.6. Inmunoensayo enzimático y la identificación de drogas en toxicología forense.....	38
1.7. Método EMIT (Técnica de inmunoensayo enzimático múltiple)	40
1.8. Fundamento EMIT.....	41
1.9. Validación de métodos analíticos.	43
1.10. Parámetros en la validación de inmunoensayos.....	46
Especificidad/ selectividad.	46
Límite de detección.	47
Precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.	47
Estabilidad.....	48
1.11. Campo de estudio.....	49
1.12. Tipo de muestra y características de la muestra.....	49

1.2 ANTECEDENTES.....	52
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	54
1.4 JUSTIFICACIÓN.....	56
1.5 HIPÓTESIS.....	57
1.6 OBJETIVOS.....	58
General.....	58
Específicos	58
2. Materiales y método	59
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	74
4. CONCLUSIONES	95
REFERENCIAS.....	97

RESUMEN

Dentro del ámbito forense se han buscado técnicas alternativas a los métodos cromatográficos y espectroscópicos tradicionales para realizar el tamizaje de drogas de abuso en matrices biológicas. Las técnicas que se han seleccionado preferentemente son las pruebas inmunoenzimáticas, que demuestran tener buena sensibilidad, son rápidas, fáciles de realizar, los reactivos que emplean presentan vida media prolongada y son económicos. Algunas de estas técnicas, han sido desarrolladas para el análisis en orina, lo cual genera inconvenientes para el examen toxicológico *post-mortem*, ya que en su mayoría se obtiene muestra sanguínea. Estas circunstancias han llevado a adaptar los métodos de inmunoensayo, que fueron diseñados principalmente para determinaciones de drogas en orina, a la detección de drogas en otros fluidos y tejidos corporales.

El objetivo de esta investigación fue adecuar y validar el inmunoensayo EMIT, desarrollado para la identificación de drogas de abuso (tetrahidrocannabinol, cocaína, benzodiazepinas y anfetamina) en orina, para usarlo en muestras de sangre *post-mortem*, determinando los parámetros establecidos por las “Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos de la Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito” (ONUDD). Se realizaron los estudios en muestras sanguíneas que de acuerdo con su historial se encuentran libres de las drogas de interés. Para la determinación de cada parámetro de validación se fortificó la muestra por un periodo de 24 horas en refrigeración, con una solución de la droga de interés de concentración conocida, se obtuvo plasma y se analizó en el equipo EMIT.

Los resultados muestran que el método presenta buena selectividad, ya que no se encuentran sustancias que alteren los resultados. Con un límite de detección confiable establecido por el equipo. El método presenta buena repetibilidad y reproducibilidad ya que los valores medidos entre el día 1 y día 2 no presentan diferencias significativas y el Coeficiente de Variación (CV) es menor al 20%. Se evaluó la estabilidad de la muestra, obteniendo que para THC (tetrahidrocannabinol)

y benzodicepinas existe buena estabilidad en un periodo de 7 días en condiciones de refrigeración, mientras que para cocaína y anfetaminas su estabilidad es menor ya que el incremento de variabilidad de resultados se percibe a partir del día 2.

En general se cumplen con las directrices establecidas por la UNODC, por lo que se establece que el método de inmunoensayo EMIT es viable para analizar muestras de sangre como alternativa a las muestras de orina.

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del cannabis.	Página 17
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la cocaína.	Página 23
Tabla 3. Características de las benzodiazepinas.	Página 24
Tabla 4. Semivida plasmática de las benzodiazepinas.	Página 26
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de las benzodiazepinas.	Página 29
Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de las anfetaminas.	Página 34
Tabla 7. Datos sobre el EMIT y drogas a analizar.	Página 42
Tabla 8. Valores del punto de corte.	Página 63
Tabla 9. Preparación de soluciones para determinar límite de detección.	Página 68
Tabla 10. Punto de corte de cada droga $\pm 25\%$	Página 69
Tabla 11. Preparación de soluciones para determinar la precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.	Página 70
Tabla 12. Punto de corte $\pm 25\%$	Página 71
Tabla 13. Preparación del parámetro estabilidad de la muestra.....	Página 71
Tabla 14. Puntos de calibración para la fortificación de la sangre.....	Página 73
Tabla 15. Resultados de los controles analizados por día.....	Página 77
Tabla 16. Tabla 16. Especificidad con concentración alta probada para cada compuesto de 20 muestras fortificadas.	Página 78
Tabla 17. Especificidad de las 20 muestras sin fortificar.	Página 79
Tabla 18. Límite de detección establecido por el equipo para cada droga.	Página 80
Tabla 19. Resultados parámetro límite de detección “nivel alto”.	Página 80
Tabla 20. Resultados del parámetro límite de detección “nivel bajo”.	Página 81
Tabla 21. Resumen de coeficientes de variación respecto a cada droga.....	Página 83
Tabla 22. Repetibilidad del método -25%	Página 84
Tabla 23. Repetibilidad del método $+25\%$	Página 85
Tabla 24. Reproducibilidad del método -25% en dos días diferentes.....	Página 86
Tabla 25. Reproducibilidad del método $+25\%$ en dos días diferentes.....	Página 87
Tabla 26. Estabilidad de la muestra fortificada con THC -25% durante 7 días de almacenamiento	Página 88
Tabla 27. Estabilidad de la muestra fortificada con Benzodiazepinas -25% durante 7 días de almacenamiento	Página 89
Tabla 28. Estabilidad de la muestra fortificada con Cocaína -25% durante 3 días de almacenamiento	Página 89
Tabla 29. Estabilidad de la muestra fortificada con Anfetaminas -25% durante 7 días de almacenamiento	Página 90
Tabla 30. Estabilidad de la muestra fortificada con THC $+25\%$ durante 7 días de almacenamiento	Página 91

Tabla 31. Estabilidad de la muestra fortificada con Benzodiazepinas +25% durante 7 días de almacenamiento Página 91

Tabla 32. Estabilidad de la muestra fortificada con Cocaína +25% durante 3 días de almacenamiento Página 92

Tabla 33. Estabilidad de la muestra fortificada con Anfetaminas +25% durante 2 días de almacenamiento Página 92

Tabla 34. Resultados de controles en el día de análisis de los casos reales
Página 93

Tabla 35. Dosis letales para cada droga evaluada Página 94

Tabla 36. Resultados de casos reales (negativas) Página 94.

Tabla 37. Resultados de casos reales (positivos a los analitos evaluados)
Página 94.

ÍNDICE FIGURAS

- Figura 1. Estructura THC (Obtenida de ChemBioDraw Ultra). Página 13
- Figura 2. Receptores de cannabinoides B1 y B2 (“THC and CBD, What Else Interacts With CB1 Cannabinoid Receptors?,” 2018). Página 16
- Figura 3. Estructura cocaína (Obtenida de ChemBioDraw Ultra). Página 18
- Figura 4. Representación de picos plasmáticos en diferentes formas de consumo. Página 19
- Figura 5. Metabolitos de Cocaína (Lizasoain, et al., 2002). Página 21
- Figura 6. Mecanismo cocaína (Volkow, 2010). Página 22
- Figura 7. Estructura general de benzodiazepinas (Obtenida de ChemBioDraw Ultra). Página 23
- Figura 8. Metabolismo benzodiazepinas (Moffat, et al., 2011). Página 27
- Figura 9. Diagrama del mecanismo de acción del neurotransmisor natural GABA y de las benzodiazepinas en las células del sistema nervioso. (Boussofara & Raucoules, 2016). Página 28
- Figura 10. Estructura de adrenalina y anfetamina (Obtenida de ChemBioDraw Ultra). Página 29
- Figura 11. Estructura metanfetamina (Obtenida de ChemBioDraw Ultra). Página 30
- Figura 12. Metabolismo Metanfetamina (Robledo, 2008). Página 32
- Figura 13. Mecanismo de las anfetaminas (Robledo, 2008). Página 33
- Figura 14. Clasificación de los inmunoensayos (Ishikawa, 1999). Página 36
- Figura 15. Principio inmunoensayo competitivo (López, 2013). Página 41
- Figura 16. Obtención del plasma. Página 60
- Figura 17. Selección de pruebas para la calibración. Página 61
- Figura 18. Posiciones en que se colocan las cubetas. Página 62
- Figura 19. Aprobación de curva de calibración. Página 62
- Figura 20. Selección de pruebas para el análisis de controles..... Página 63
- Figura 21. Lectura de controles Página 64
- Figura 22. Registro de la muestra en el equipo Página 64
- Figura 23. Posiciones de cubetas en el rotor y en el software..... Página 66
- Figura 24. Calibración THC. Página 74
- Figura 25. Calibración Benzodiazepinas. Página 74
- Figura 26. Calibración Cocaína. Página 74
- Figura 27. Calibración Anfetaminas. Página 74
- Figura 28. Calibración 2 THC. Página 75
- Figura 29. Calibración 2 Benzodiazepinas. Página 75
- Figura 30. Calibración 2 Cocaína. Página 75
- Figura 31. Calibración 2 Anfetaminas..... Página 75

1. MARCO TEÓRICO

Droga

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el concepto de droga de abuso aplica, (Espinosa, et al, 2017), “a toda sustancia que introducida en el organismo por cualquier vía de administración, produce una alteración en el funcionamiento natural del sistema nervioso central del individuo y es, además, susceptible de crear dependencia, ya sea psicológica, física o ambas”. Las drogas pueden ser de origen natural o artificial, que al consumirlas constantemente genera tolerancia (necesidad de aumentar la dosis) y dependencia, el uso imprudente causa daños a la persona y al contexto que lo rodea. Las drogas pueden ser ilegales, esto significa, que no son aceptados por la ley, que al consumir o poseer este tipo de drogas conduce a un delito. (Espinosa, et al., 2017).

El uso de drogas ilegales es un problema que comienza a edad temprana, alrededor de los 17 años, generando manifestaciones de dependencia (Rojas, et al., 2011). Además el consumo de drogas ilícitas ha generado una problemática importante en el tema de salud pública, ya que causa efectos negativos sobre la salud en la población que lo realiza (González, et al., 2016).

Existen diversos factores que llevan a los jóvenes al consumo de drogas, entre los cuales influyen: familiares (abandono de padres), el querer pertenecer a un grupo social siendo convencidos por amigos, problemas psicológicos como la depresión, ansiedad, estrés, baja autoestima o que estos adolescentes están aburridos y tienen el deseo de experimentar o buscan librarse de sus problemas y sentirse bien; entre más factores de riesgo estén expuestos los jóvenes, mayor es la probabilidad de querer consumir sustancias ilegales (Sánchez, et al., 2014). En el consumo de las drogas no hay distinción de usuarios, se presenta sin importar el género, edad, grupo social, lugar de procedencia; todos se pueden ver afectados (ONUDD, 2014).

Clasificación de los niveles de consumo según (Saccone y Ryan, 2011).

- Uso: de drogas tanto como legales e ilegales se caracteriza por ser esporádico y ocasional, por lo que también este nivel de consumo llega a causar problemas en los usuarios.
- Abuso: se define como un abuso en el consumo de las drogas, utilizándolas en periodos de tiempo más cortos, donde hay un uso intencional, con el fin de cubrir ciertas necesidades, por ejemplo: divertirse, librarse de problemas, reducir la fatiga etc.
- Adicción: es cuando los consumidores generan una dependencia a la sustancia, y ahora es necesario su consumo, se puede decir que sufren una adicción, y recurren al consumo en mayores cantidades y con más frecuencia para sentir efecto físico y psicológico.

1.1. Epidemiología

Cerca de 275 millones (el 5.6%) de personas en el mundo, de edades entre los 15 y los 64 años, ha consumido drogas al menos una vez en 2016. En 31 millones de personas existen trastornos derivados al consumo de drogas, determinando que el consumo de drogas genera problemas de salud por lo que sus usuarios podrían necesitar tratamiento (Carpentier et al, 2018).

La marihuana fue la sustancia psicoactiva que más se consumió en 2016, siendo 192 millones de personas que la consumieron al menos una vez en este año. Su consumo sigue aumentando considerablemente, presentando un incremento cerca del 16% respecto a la población mundial (Carpentier et al., 2018).

En nuestro país se encuentra que, de la población total, en un rango de edad de 12 a 65 años el 10.3% consumió cualquier tipo de droga una vez en la vida, donde el 0.6% presenta una dependencia a este tipo de sustancia, mientras que, específicamente para drogas ilegales el 9.9% las ha consumido. La edad promedio de inicio de consumo de drogas es de 17.8 años (Tapia, Medina, y Sepúlveda, 2016)

1.2. Mortalidad asociada

De acuerdo con la OMS, en 2015 cerca de 450,000 personas fallecieron debido al consumo de drogas. De esas muertes, 167,750 se encontraban ligadas a trastornos causados por el consumo de drogas (sobredosis, principalmente). El otro tanto de muertes no estaban directamente relacionadas al consumo de drogas, pero se le atribuía a la práctica insegura de inyección, adquiriendo VIH y hepatitis (Philip, Pietschmann, & Niaz, 2018).

1.3 Drogas de abuso

Valenzuela (2013), clasificó a las drogas en grupos de sustancias químicas consideradas

- A. OPIO (*Papaver somniferum*) Opiáceos: Morfina, codeína, tebaína, hasta 26 alcaloides naturales
- B. DEPRESORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
 - Barbitúricos*: Principalmente de acción corta y larga: - Amobarbital y Fenobarbital
 - Benzodiazepinas*: Más de 35 congéneres de acción Corta: Midazolam, Triazolam, Lorazepam, Oxazepam - Larga: Diazepam, Clordiazepóxido, Flurazepam y otros
 - Alcohol etílico*: bebidas fermentadas y destiladas
- C. PSICOESTIMULANTES
 - Coca y cocaína base (crack)*, pasta de coca (sulfato de cocaína), clorhidrato de cocaína.
 - Anfetaminas*: Anfetamina, Metanfetamina, Metilfenidato, Fentermina, - Anfetaminas de diseño: 3,4-metilendioxfanfetamina (MDA, "píldora del amor"), MDMA (Éxtasis) y otras
- D. NICOTINA Y TABACO
- E. CANNABINOIDES Marihuana (*Cannabis sativa*): El principal componente psicoactivo es el D-9-THC (Delta-9-tetrahidrocannabinol)
- F. PSICODÉLICOS O ALUCINÓGENOS: LSD, Khat, Peyote (Mescalina) y otros
- G. ARILCICLOHEXILAMINAS: Fenciclidina (PCP), Ketamina

Cannabis (Tetrahidrocannabinol)

El *Cannabis*, es una planta de la que se ha tenido uso desde inicios de la civilización y se ha empleado para producir una gran variedad de productos, de los cuales destacan los de uso medicinal. Este vegetal se caracteriza por contener un grupo de sustancias conocidos como cannabinoides, los cuales se han estudiado ya que producen un efecto psicoactivo en los seres humanos (Esther, López, Brindis, Niizawa, & Martínez, 2014).

En esta planta se han encontrado alrededor de 500 compuestos, de los cuales están los cannabinoides, terpenos, flavonoides etc. Los cannabinoides son los metabolitos que se encuentran en mayor proporción y son característicos de la especie, entre los cuales el 9 delta tetrahidrocannabinol (9 Δ THC) es el más estudiado (Esther et al., 2014). El 9 delta THC (Figura 1) presente en la marihuana, es el metabolito de mayor interés forense. A este metabolito se le han adjudicado efectos farmacológicos, así como, antiepiléptico, antiinflamatorio, estimulante del apetito entre otros (Volkow et al., 2014).

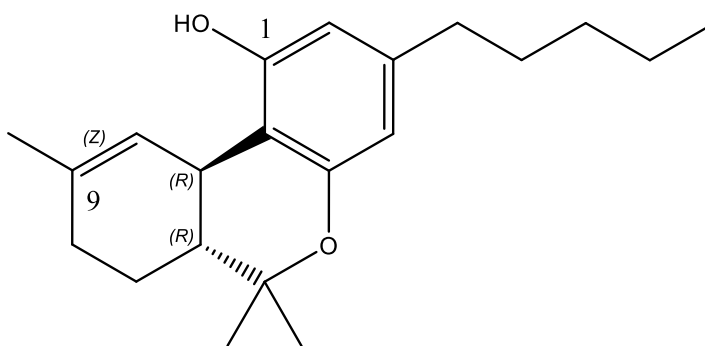


Figura 1. Estructura THC (Obtenida de ChemBioDraw Ultra)

Absorción

La principal forma de consumir la marihuana es fumada, por lo que en su administración se alcanzará de un 10 a un 25% del contenido de THC en el cigarro. Donde también depende la cantidad y profundidad de fumadas que se le dan al cigarro. Pasando entre 1 y 2 minutos de la primera fumada el THC se puede detectar en sangre, con una T_{max} (tiempo en el que el fármaco alcanza la concentración máxima en sangre) de 3 a 10 minutos. Los efectos se inician a los pocos segundos y pueden durar entre 2 y 3 horas (Tamosiuna, et al., 2013). Mientras se está fumando, el 30% del THC es destruido por la combustión, mientras que cerca de un 50% se pierde en el aire (Abanades, et al., 2005).

Mediante la vía oral su absorción es lenta y escasa, que va de un 5 a 10%, debido a que se destruye en el estómago, presenta una T_{max} en sangre a las 2 a 4 horas de haber sido consumida y sus efectos inician posterior a 30 minutos. Dichos efectos llegan a durar hasta 6 horas (Tamosiunas, et al., 2013). Debido a que se presenta el fenómeno de primer paso hepático, parte del THC se metaboliza antes de llegar a la circulación. (Abanades et al., 2005).

Distribución

Ya que la distribución del THC y sus metabolitos es amplia por todo el organismo, no requiere un transporte específico, de su distribución en sangre el 90% se une a plasma, del cual entre el 95 y 99% se une proteínas, principalmente a lipoproteínas y en menor cantidad a la albúmina, por otra parte, el 10% restante se distribuye en los eritrocitos. Debido a que el THC es de carácter liposoluble y tiene alta afinidad a los tejidos, especialmente tejido adiposo, favorece a la prolongación de efectos y acumulación en el organismo, de este modo atraviesa con facilidad las barreras hematoencefálica, placentaria y mamaria (Escobar, et al., 2009).

Metabolismo

El metabolismo del THC se efectúa principalmente en el hígado por las enzimas del sistema citocromo P450 mediante reacciones de hidroxilación, oxidación y glucuronidación (Escobar, et al., 2009); generando una reacción de hidroxilación sobre el 9 Δ -THC en el carbono 11 obteniendo el 11-hidroxi-tetrahidrocannabinol (11-OH-THC), que es el principal metabolito activo de los cannabinoides (Netzahualcoyotzi, et al., 2009). En general, el proceso del metabolismo ocurre en dos fases: la primera corresponde a las reacciones de hidroxilación y de oxidación, en donde se obtiene 11-nor-9-carboxi-THC (THC-COOH, metabolito inactivo) y la segunda da origen al conjugado THC-COOH mediante una reacción de conjugación con el ácido glucurónico (Abanades et al., 2005).

Eliminación

La vida media de eliminación del THC en plasma es de 25-36 horas, respecto al 11-OH-THC es de 12-36 horas y 25-55 horas en el caso THCCOOH. Un 80% se elimina a mediante las heces, donde se identifican principalmente metabolitos no conjugados, ácidos y neutros del THC; el 20% restante se elimina a través de la orina como THCCOOH, metabolitos en forma conjugada y polares. El THCCOOH es el marcador biológico que se utiliza para detectar consumo de cannabinoides (Abanades et al., 2005). Tras el consumo de un cigarro es posible detectar en orina metabolitos una semana después, y en los consumidores activos se sigue identificando luego de un mes de haber dejado de consumir (Tamosiunas, et al., 2013).

Farmacodinamia

Hoy en día se conocen dos receptores de cannabinoides: CB1 y CB2. El receptor CB1, también conocido como receptor central, se encuentran distribuidos principalmente en el sistema nervioso central, siendo los responsables de los efectos psicoactivos. El receptor CB2 se conoce como receptor periférico, y se ha encontrado en el bazo y en células del sistema inmune, los cuales son responsables

de las acciones inmunomoduladoras de los cannabinoides (figura 2) (Escobar, et al., 2009).

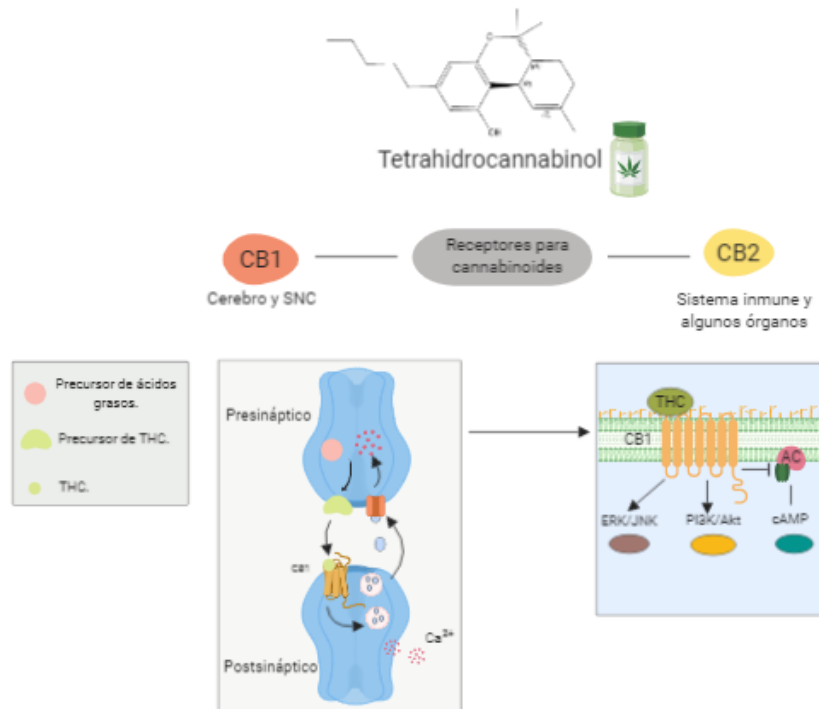


Figura 2. Receptores de cannabinoides B1 y B2 (“THC and CBD, What Else Interacts With CB1 Cannabinoid Receptors?,” 2018).

Efectos

Los efectos del THC se producen en dos fases, inicialmente de estimulación que se ven reflejados como (euforia, bienestar, aumento de la percepción), consecuentemente se genera un efecto de sedación (relajación, somnolencia). Se produce una agudización de las percepciones visuales, auditivas y táctiles, así como una ligera distorsión del espacio y tiempo (Abanades et al., 2005). La dosis con la que se pueden lograr efectos tenues es aproximadamente de 5 mg de 9 Δ -THC por vía fumada o inhalada, o 10 mg por vía oral. Dosis superiores a 20 mg por inhalación o 70 mg por vía oral pueden provocar efectos muy intensos (Abanades et al., 2005).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas cannabis

Nombre	Tetrahidrocannabinol o delta-9-tetrahidrocannabinol
Fórmula	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
Peso molecular	314,45 g/mol
Punto de ebullición	157°C
Apariencia a temperatura ambiente	Sólido cristalino a baja temperatura, viscoso al calentarse
Solubilidad	No soluble en agua, altamente soluble en lípidos, alcoholes e hidrocarburos como el butano

Cocaína

La cocaína es un psicotrópico altamente adictivo que afecta directamente al cerebro; su principal alcaloide: la benzoilmetilecgonina, es obtenido a partir de las hojas del arbusto *Erithroxylon coca*, originario de América del sur. A través de una serie de procesos químicos que incluyen sustancias como queroseno y ácido sulfúrico, se obtiene la pasta de coca, que es extraída de las hojas y convertida en cocaína base, (figura 3); y por su gran popularidad y uso extendido, ha sido llamada “la droga de los años ochenta y noventa” (González, et al., 2015; Volkow, 2010).

Principalmente, la cocaína se presenta en dos formas químicas: la sal soluble en agua (clorhidrato) que puede aspirarse o inyectarse, y la base insoluble en agua (crack), que generalmente se consume fumada. La cocaína en forma de clorhidrato es rebajada usando adulterantes como lidocaína, cafeína o azúcares como el manitol, por lo que llega a tener una pureza de 30 al 90% (Volkow, 2010).

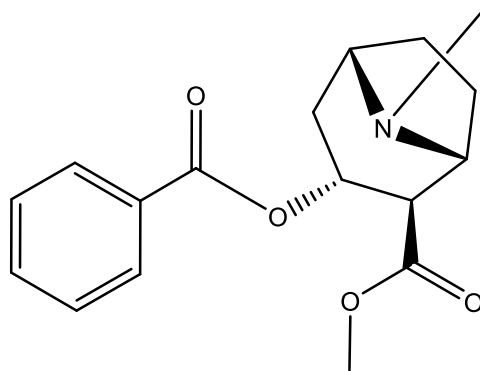


Figura 3. Estructura cocaína (Obtenida de ChemBioDraw Ultra).

Absorción

La mayoría de las veces, el clorhidrato de cocaína se presenta como un polvo cristalino blanco o blanco apagado, es la sal de la cocaína formada con ácido clorhídrico. Se administra por vía inhalatoria (para esnifar), que es la forma más común de consumo; la absorción es rápida debido a la intensa vascularización de la mucosa de la nasofaringe, asimismo sus efectos (euforia y sensación de energía), que se mantienen entre 20 y 40 minutos. También se administra por vía intravenosa (no se puede fumar puesto que se destruye por el calor); los efectos farmacológicos y psíquicos por esta vía son inmediatos (30 segundos) y potentes, pero de corta duración (de 10 a 20 minutos) (Lizasoain, et al. 2002).

Por su parte, la cocaína base se obtiene mezclando el clorhidrato de cocaína con una solución alcalina, por ejemplo: amoníaco, hidróxido de sodio o bicarbonato sódico. El "crack" es una forma de cocaína que se obtiene calentando una mezcla en la que se agrega amoníaco a una solución de clorhidrato de cocaína en presencia de bicarbonato sódico para bajar el pH, la base libre se precipita en forma de pasta. El crack se distribuye rápidamente de pulmones a cerebro; sus efectos son inmediatos (5 segundos), muy intensos (10 veces superiores a la cocaína i.v.(intravenoso) o esnifada y momentáneos (4 minutos) (Lizasoain, et al., 2002).

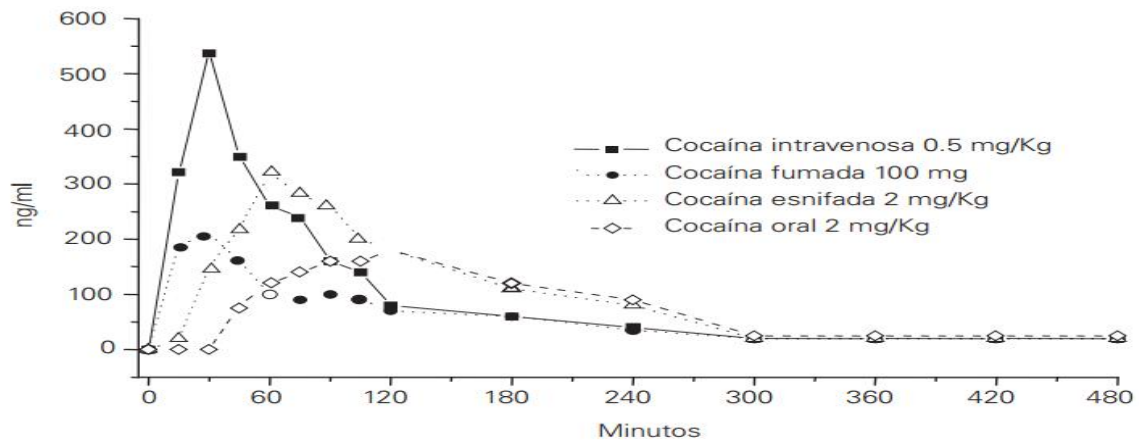


Figura 4. Representación de picos plasmáticos en diferentes formas de consumo.

En la figura 4, se observan las diferencias en los tiempos que se presentan los picos plasmáticos producidos después del consumo de la misma dosis de cocaína por diferentes vías de administración en participantes sanos (Lizasoain, et al., 2002).

Los efectos al administrar de manera intravenosa (clorhidrato de cocaína) o de forma fumada (cocaína base), son más rápidos que si se administra de manera oral o nasal, debido a las características químicas de la droga, como:

1. Cuando es administrada por vía oral no es muy estable en el tracto gastrointestinal y su producto de degradación no es activo.
2. No se absorbe con facilidad del tracto gastrointestinal.
3. No es resistente a la degradación del metabolismo de primer paso.

Este hecho se relaciona directamente con la concentración de cocaína en sangre que es mayor tanto en la administración intravenosa como en la fumada y es menor en la oral e intranasal (Crespo y Rodríguez, 2007).

Distribución

Debido a la alta liposolubilidad de la cocaína, una vez en el torrente sanguíneo atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica (Crespo y Rodríguez, 2007). La fase de distribución posterior a la administración de cocaína es muy rápida. Los órganos con las concentraciones más altas de la droga son cerebro, bazo, riñón y pulmón, seguidos de sangre, corazón y músculo (Bortolotti, et al., 2012). La concentración plasmática máxima se alcanza a cerca de los 60 minutos cuando se administra de manera nasal u oral, la biodisponibilidad nasal es de un 30 a 40%, la base libre o “crack” tiene una vida media de 38 minutos correspondiente a una biodisponibilidad del 70% y cuando se administra intravenosamente su biodisponibilidad del 100% (Lizasoain, et al., 2002).

Metabolismo

La cocaína es rápidamente metabolizada a benzoilecgonina que se produce en un 45%, porcentaje similar a la hidrólisis de ecgonina metil éster 40%; llevado a cabo por enzimas presentes en el hígado y en plasma mediante una reacción de hidrólisis. El nitroxido de norcocaína y otros radicales libres son metabolitos activos, pero se generan en pequeñas cantidades que generalmente no tienen actividad farmacológica (Lizasoain, et al., 2002).

La benzoilecgonina (figura 5), es el metabolito que se busca para identificar intoxicaciones. Se puede detectar en orina 3-4 días después del último consumo, dependiendo de la cantidad de cocaína consumida y del valor de corte establecido o de la sensibilidad de la prueba. La vía de administración también influye en la cantidad de (benzoilecgonina) que se detecta en plasma (López, 2013).

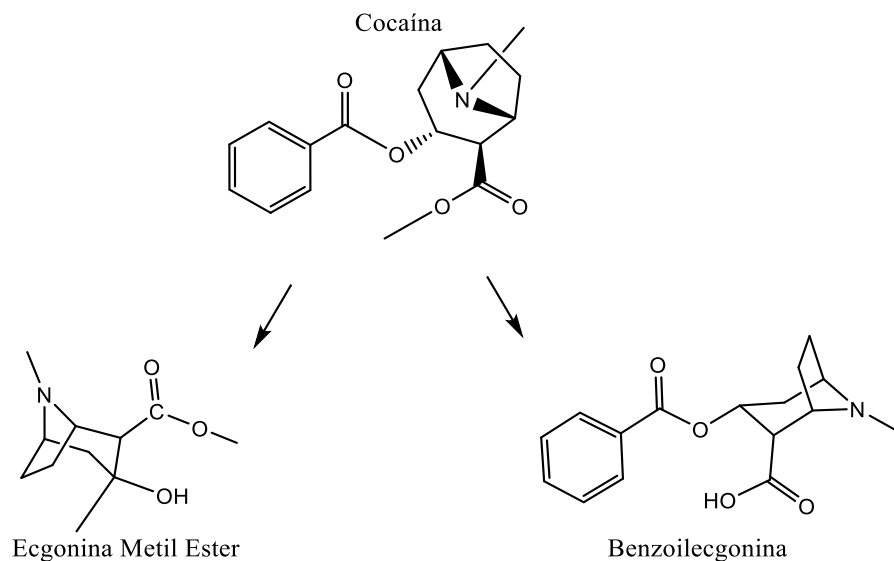


Figura 5. Metabolitos de Cocaína (Lizasoain, et al., 2002)

Eliminación

Se conocen dos formas en las que el organismo desecha la cocaína: una vía rápida, por desintegración metabólica y una vía lenta, por medio de metabolización y excreción. La depuración es rápida, va de 20 a 30 ml/min/Kg; siendo su vida media plasmática de 1 a 1.5 horas. La vida media plasmática de benzoilecgonina se presenta en un rango de 6 a 8 horas y la vida media plasmática de ecgonina metil éster de 3 a 8 horas (Lizasoain, et al. 2002).

En la orina se excreta el uno por ciento de la cocaína sin modificarse la estructura original. La mayor parte de la cocaína se elimina como benzoilecgonina, el metabolito de mayor importancia. La cocaína también se desecha en cantidades menores en forma de ecgonina metil éster y ecgonina (Crespo y Rodríguez, 2007).

Farmacodinamia

Lorenzo (2008) refiere que la cocaína se une a las proteínas plasmáticas transportadoras de dopamina, serotonina y noradrenalina bloqueando su recaptación en la terminal presináptica. La inhibición de la recaptación eleva las concentraciones sinápticas de cada uno de estos neurotransmisores, por lo tanto, potencia y prolonga sus acciones centrales y periféricas. Los efectos psicoestimulantes de la cocaína están mediados por su capacidad para potenciar la actividad dopaminérgica. Tiene afinidad por sitios de unión de receptores tales como receptores serotoninérgicos, receptores muscarínicos M1, M2 y receptores sigma. (Figura 6).

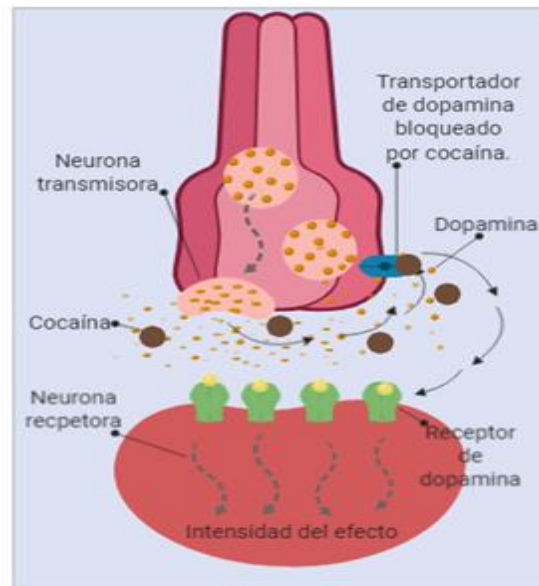


Figura 6. Mecanismo cocaína (Volkow, 2010).

Efectos

Los efectos de la cocaína se manifiestan de manera instantánea posterior a su consumo y se desvanecen en minutos o al paso de una hora. Los consumidores se sienten con euforia, energía, conversadores y mentalmente alertas, también puede disminuir el apetito y la necesidad de dormir. De los efectos a corto plazo se identifican la contracción de los vasos sanguíneos, dilatación de pupilas, aumento de la frecuencia cardíaca, presión arterial y temperatura corporal. Algunas personas

refieren haber presentado irritabilidad, temblores, vértigo, espasmos musculares y ansiedad (Volkow, 2010).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la cocaína.

Nombre		Cocaína
Fórmula		$C_{17}H_{21}NO_4$.
Peso molecular		303.35 g/mol
Punto de ebullición		187°C
Apariencia a temperatura ambiente	Clorohidrato	Polvo blanco
	Crack	Piedra amarillenta o blanquecina
Solubilidad	Clorohidrato	Soluble en agua
	Crack	Soluble en solventes orgánicos

Benzodiazepinas.

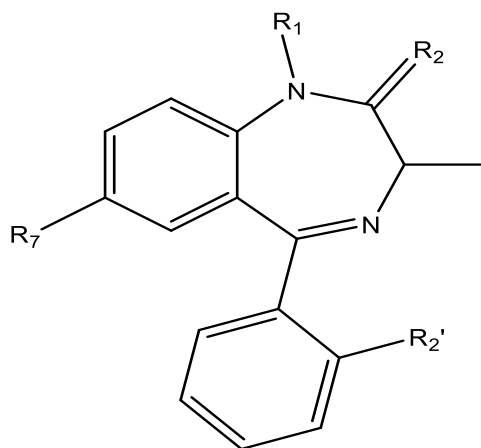


Figura 7. Estructura general de benzodiazepinas (Obtenida de ChemBioDraw Ultra).

Las benzodiazepinas (figura 7) son medicamentos que tienen acción farmacológica sobre el sistema nervioso central, con efectos sedantes, hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivos y relajantes musculares. Por ello estos fármacos son

utilizados en medicina para el tratamiento de la ansiedad, insomnio y otras afecciones, así como las epilepsias, abstinencia alcohólica y espasmos musculares (Piña, 2013). Lorenzo et al., (2008), refiere que en su mayoría son sustancias lipofílicas y se pueden clasificar en grupos de acuerdo a su estructura química: las 1,4-benzodiazepinas, caracterizadas por tener dos átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 4 del anillo B y las 1,5 benzodiazepinas con átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 5. También pueden clasificarse por los radicales que caracterizan su espectro, en 2-ceto, 7-nitro, 3-hidroxi y triazolo.

Tabla 3. Características de las benzodiazepinas de acuerdo a Lorenzo et al., (2008)

PROPIEDADES	ACCIÓN
Ansiolítica	Reducen la tensión emocional, aunque pueden producir efectos paradójicos de irritabilidad y hostilidad.
Relajante muscular	Su mecanismo implica varias estructuras del SNC: médula espinal, formación reticular, ganglios basales y cerebelo.
Anticonvulsivante	Su acción anticonvulsivante se ejerce tanto en convulsiones experimentales (estricina, cardiazol, electroshock) como clínicas (convulsiones febriles, epilépticas, etc.).
Hipnótica	La benzodiazepinas son inductoras del sueño, disminuye el tiempo de latencia para el comienzo del sueño no-REM, el tiempo de vigilia y el número de despertantes, aumentando, por lo tanto, el tiempo total del sueño.

Absorción

La mayoría de las benzodiazepinas se administra por vía oral, a excepción del clorazepato, que sufre una descarboxilación al contacto con el jugo gástrico. La mayor parte de estos fármacos tienen poca absorción por vía intramuscular; excepto para lorazepam, y en caso de urgencia es preferible utilizar la vía intravenosa; la administración profunda en el deltoides sería la más adecuado, debido a que se evita el tejido adiposo y la mayor vascularización de la zona (Lorenzo et al., 2008).

Las benzodiacepinas, en general, se absorben de manera fácil en las primeras secciones del aparato digestivo y en un periodo de 2 a 4 horas alcanzan su máxima concentración plasmática. Sin embargo, hay diferencias en la rapidez de absorción entre el diazepam y el clorazepato que son de acción clínica rápida, mientras prazepam y oxazepam son de acción lenta. En general, la biodisponibilidad de estos fármacos es elevada, oscilando entre el 78 y 100% (Lorenzo et al., 2008).

Distribución

La distribución de las benzodiacepinas por el organismo es amplia dependiendo de la lipofilia de las moléculas, en el líquido cefalorraquídeo la concentración es similar a la del fármaco libre en el plasma, atraviesan la placenta, ya que se establece un equilibrio dinámico en función de la afinidad por los tipos de tejidos (el cerebro tiene un alto componente de lípidos) (Fernandez, et al., 2003; Lorenzo et al., 2008).

Los benzodiacepinas para su transporte se acoplan por lo regular a las proteínas plasmáticas, especialmente a la albúmina. La fracción que no está unida a una proteína es la que presenta actividad, en este caso es del 10% para el lorazepam, del 2-6% para el midazolam y menor del 2% para el diazepam. Cuando una persona presenta una disminución de la albumina por mal estado nutricional o a una insuficiencia hepática o renal, existe un aumento de la fracción libre de las benzodiacepinas, por ende una potenciación de los efectos clínicos (Boussofara y Raucoules, 2016).

La vida media plasmática se diferencia por el tiempo de acción en el que se obtienen los efectos y la duración de estos, se relaciona con la presencia de concentraciones efectivas en el sistema nervioso, que depende del volumen de distribución y afinidad por los lípidos (Lorenzo et al., 2008).

Tabla 4. Semivida plasmática de las benzodiazepinas

Larga (> 30 horas)	Intermedia (25-30 horas)	Corta (6-24 horas)	Ultracorta (<6 horas)
Clobazam	Bromazepam	Alprazolam	Triazolam
Clorazepato	Flunitrazepam	Bentazepam	Midazolam
Clordiazepóxido	Nitrazepam	Lorazepam	
Diazepam	Ketazolam	Lormetazepam	
Flurazepam		Oxazepam	
Quazepam		Temazepam	

Metabolismo

El derivado desmetilado del diazepam (desmetildiazepam) es una vía final común con otras benzodiazepinas, como clordiazepóxido y clorazepato (Lorenzo et al., 2008). Muchos de los metabolitos del prototipo benzodiazepina, diazepam, muestra actividad farmacológica, que incluye desmetildiazepam (nordazepam), 3-hidroxiclorazepam (temazepam) y desmetil-3-hidroxiclorazepam (oxazepam) entre otros (Moffat, et al., 2011).

Las benzodiazepinas se metabolizan en el hígado mediante las de las siguientes vías (figura 8): a) oxidación (medazepam y prazepam); b) desmetilación o desalquilación (clordiazepóxido, ketazolam y clobazam); c) hidroxilación (alprazolam, bromazepam, clotiazepam y desmetildiazepam); d) conjugación o glucoronidación (orazepam y oxazepam) y e) nitroreducción (nitrazepam, clonazepam y flunitrazepam). Los productos resultantes en orina son conjugados en su mayoría con ácido glucurónico o con iones de sulfato, estos no poseen actividad farmacológica. Los sistemas enzimáticos microsomales del hígado que participan en la metabolización de los medicamentos, son los que contribuyen en la depuración o eliminación de todas las benzodiazepinas (Lorenzo et al., 2008).

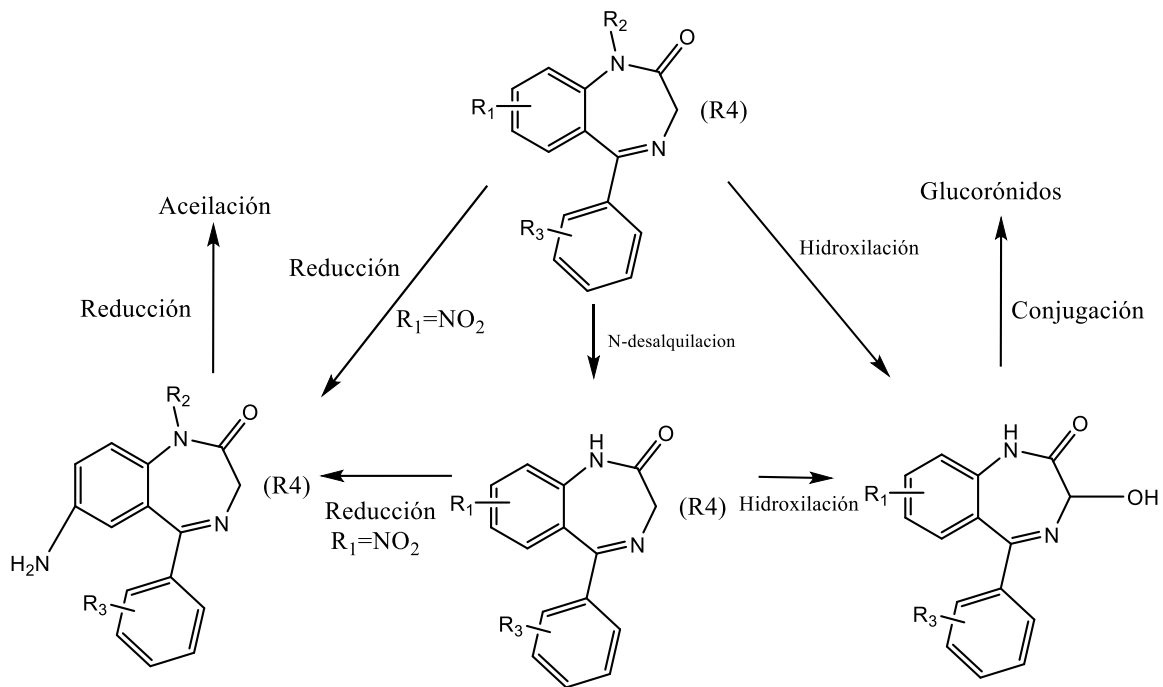


Figura 8. Metabolismo benzodiazepinas (Moffat, et al., 2011).

Eliminación

Lorenzo et al., (2008) menciona que al terminar el proceso biotransformación del principio activo, da paso a la excreción de los metabolitos. Así que cuando los fármacos son solubles en agua o se hacen hidrosolubles por el metabolismo, como es el caso de las benzodiazepinas, se eliminan del cuerpo por medio de la orina y una escasa parte lo hace a través de la bilis y, finalmente, por las heces; una característica que no es trascendente pero no por ello deja de ser importante para mencionarlo, es cuando el líquido es excretado por el riñón y presenta un pH ácido, se elimina el fármaco básico.

Farmacodinamia

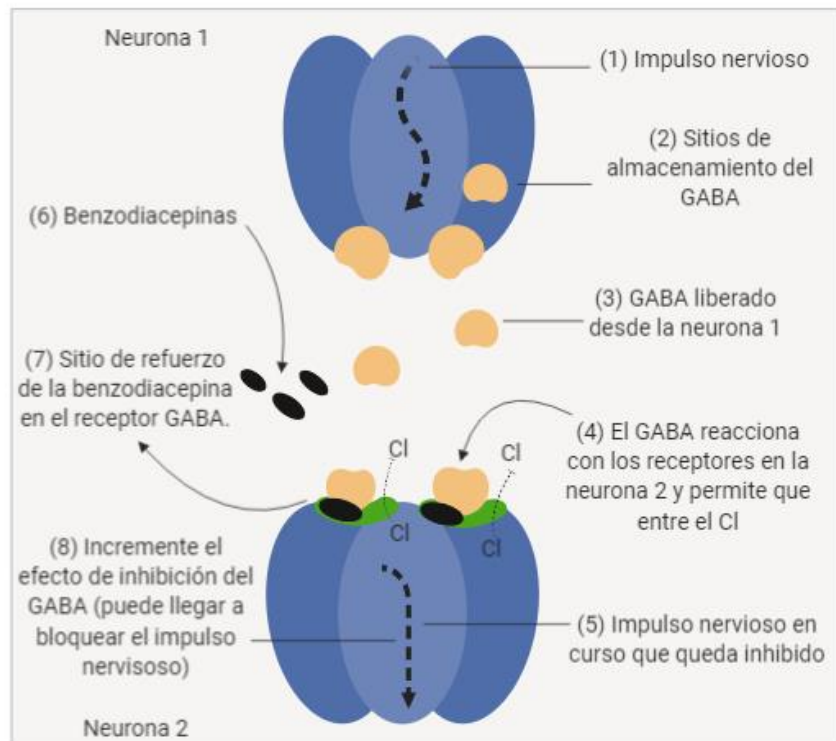


Figura 9. Diagrama del mecanismo de acción del neurotransmisor natural GABA y de las benzodiacepinas en las células del sistema nervioso. (Boussofara y Raucoules, 2016).

En la figura 9 se representa un aumento de la inhibición del GABA ocasionado por la presencia de benzodiacepinas en la región sináptica, se ve reflejado con una baja en la producción cerebral de neurotransmisores, incluyendo la producción de norepinefrina (noradrenalina), serotonina, acetil-colina y dopamina. Dichos neurotransmisores tienen acción para cumplir las funciones involucradas en el estado normal de vigilia y alerta, memoria, respuestas emocionales, control del ritmo cardíaco y de la tensión sanguínea, derivado a esta disminución se van a presentar efectos de sedación, somnolencia, disminución de reflejos, reducción de energía, depresión respiratoria, disminución del ritmo cardíaco entre otros (Lorenzo et al., 2008).

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas benzodiazepinas.

Nombre	Benzodiazepinas
Fórmula	$C_{15}H_{12}N_2O$
Peso molecular	236.266 g/mol
Solubilidad	Mayor solubilidad en aceites

Anfetaminas

Como sustancias derivadas de las anfetaminas se adjuntan todas aquellas que derivan de la fenilisopropilamina y sus diferentes transformaciones (Utrilla, 2000). Su estructura química es similar a la adrenalina, son aminas simpaticomiméticas, por ende, la actividad estimulante que ejerce sobre el sistema nervioso central y la reducción de esta sobre la periferia del organismo, dependen de que tan apartado esté el compuesto químico de la estructura de la adrenalina, (figura 10) (Robledo, 2008).

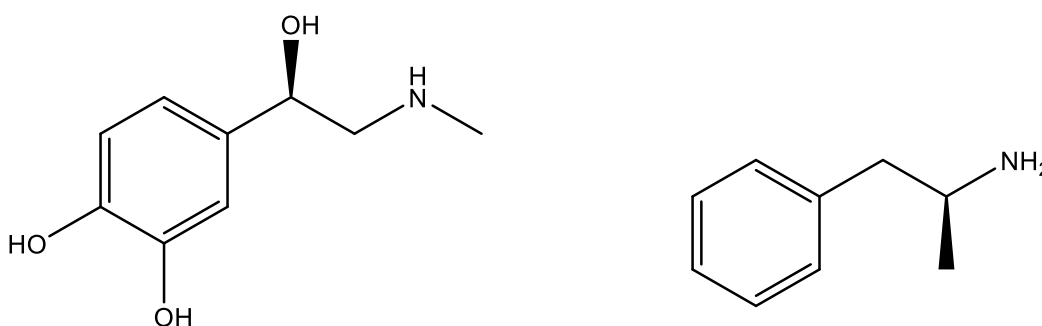


Figura 10. Estructura de adrenalina y anfetamina (Obtenida de ChemBioDraw Ultra).

El sulfato de D-anfetamina (dexedrina) y el sulfato de anfetamina (benzedrina) son las dos anfetaminas más utilizadas, de las que derivan las drogas más modernas. A su vez, los preparados psicoestimulantes anfetamínicos más

utilizados destacan la anfetamina y metanfetamina (figura 11), que son de gran importancia, puesto que son la base del grupo de MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina; éxtasis), el MDA (Adán) y el MDE (Eva) (Robledo, 2008).

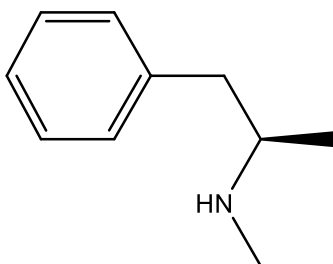


Figura 11. Estructura metanfetamina (Obtenida de ChemBioDraw Ultra).

Utrilla (2000), argumenta que en la actualidad, las modificaciones de la molécula se dirigen en dos sentidos: en el ámbito terapéutico, con la búsqueda de sustancias en las que predomine el efecto sobre el estimulante del SNC; y en el ámbito ilícito, buscando estructuras en las que la acción estimulante se transforme en alucinógena, consiguiendo cada vez mayor potencia; la aparición del efecto alucinógeno se obtiene con sustituyentes pequeños en el grupo amino, los cuales incrementan la liposolubilidad, como ocurre con la Metanfetamina o bien en el anillo bencénico, fundamentalmente en posición 4. El efecto crece a medida que aumenta el tamaño del sustituyente, alcanzando el máximo con el grupo propilo.

Absorción

Generalmente, los derivados anfetamínicos se absorben de manera favorable por vía oral, originándose efectos en 30 minutos; a su vez, se pueden administrar parentalmente, en donde los efectos sufren conmutaciones en especial en el consumo recreacional, donde se han puntualizado efectos alucinógenos. La absorción total se produce alrededor de 4 o 6 horas después de ser ingerida (Utrilla, 2000). La metanfetamina se detecta inmediatamente en sangre cuando lo que se

inhala es su vapor, sin embargo, su concentración plasmática aumenta lentamente, obteniéndose el máximo alrededor de 2 a 3 horas, en contraste con el pico tardío plasmático, los sujetos presentan efectos subjetivos máximos, los cuales son similares a los que se observan a los pocos minutos de la inhalación del vapor (Urrutia, 2013).

Distribución

Debido a su favorable liposolubilidad es posible que atraviesen barreras orgánicas, principalmente la barrera hematoencefálica; donde producen efectos sobre el Sistema Nervioso Central (Fernandez y Lizasoain, 2003). Ocasionan una cierta acumulación en el cerebro, riñón y pulmón. La unión a proteínas plasmáticas es escasa (15 al 30%) (Utrilla, 2000).

Metabolismo

La absorción de las anfetaminas ocurre de manera inmediata en el tracto gastrointestinal y son eliminadas por el hígado o inalteradamente por la orina, el tipo de eliminación se ve favorecido por el pH de la orina. La anfetamina es el principal metabolito activo de la metanfetamina (figura 12), (Utrilla, 2000).

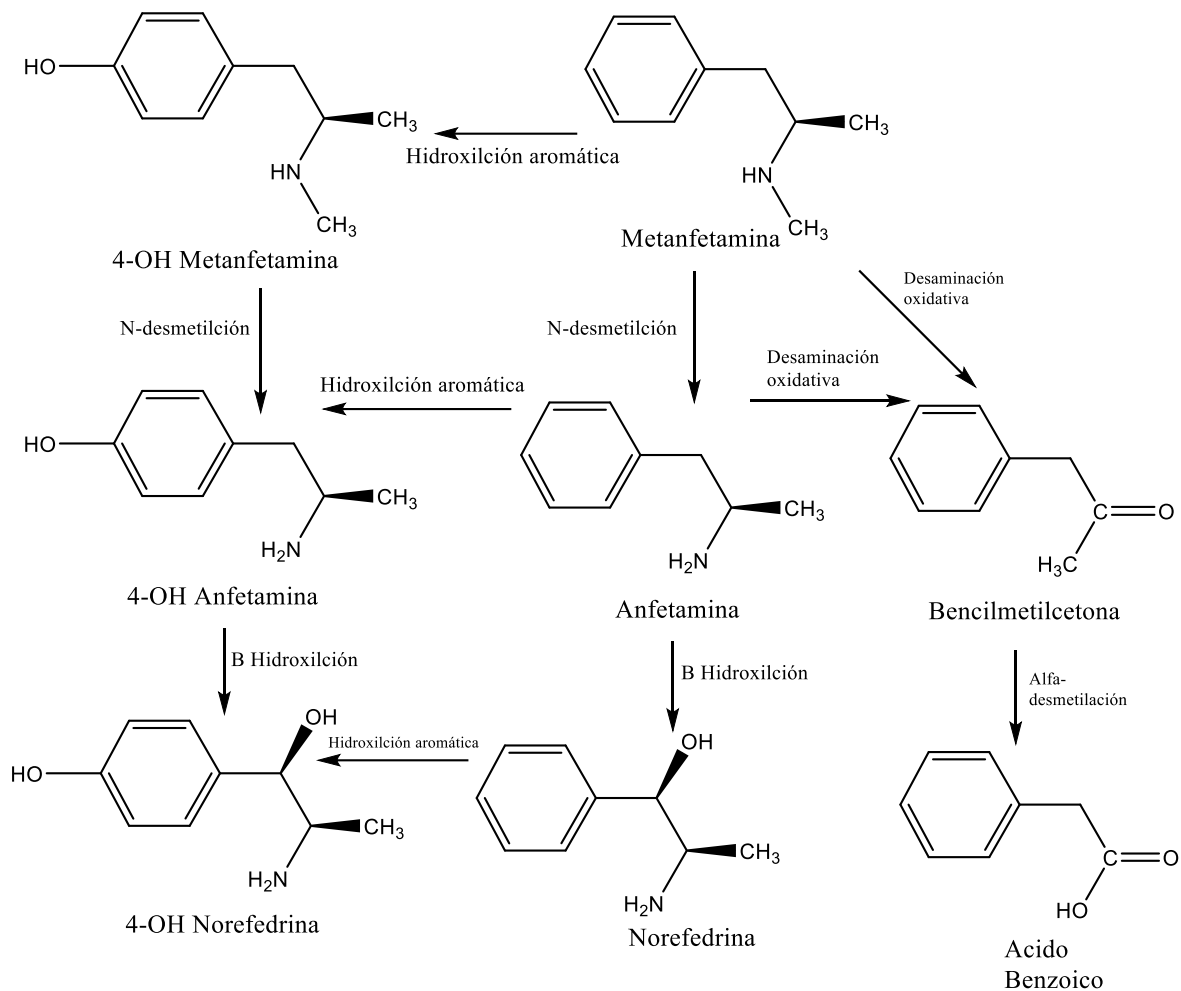


Figura 12. Metabolismo Metanfetamina (Robledo, 2008).

Asimismo, la d-anfetamina es metabolizada entre el 50-70% de la dosis administrada, por lo que su forma activa es eliminada en gran parte por orina (Utrilla, 2000).

Eliminación

La eliminación incrementa en función del pH de la orina, por lo tanto, la acidificación urinaria incrementa la velocidad de eliminación alrededor de un 80% (Robledo, 2008).

Farmacodinamia

Las anfetaminas tienen un mecanismo de acción que involucra a varios neurotransmisores como son la dopamina, la serotonina, la adrenalina y la noradrenalina (figura 13). El aumento de la concentración del neurotransmisor en el espacio sináptico se produce por bloqueo de la recaptación, ya que la d-anfetamina puede penetrar en la neurona y desplazar a la dopamina de sus depósitos citoplasmáticos. Al ser transportadas hasta las terminales nerviosas mediante la recaptación, las anfetaminas facilitan la liberación de noradrenalina. Una vez en las terminaciones nerviosas, éstas son captadas por el transportador vesicular a cambio de noradrenalina, que se escapa al citosol. Por lo tanto, es posible explicar mediante este mecanismo, los efectos centrales que las anfetaminas producen, como el aumento de la actividad motora, disminución del cansancio y los efectos periféricos, como taquicardia, sudoración y dificultad en la micción (Robledo, 2008).

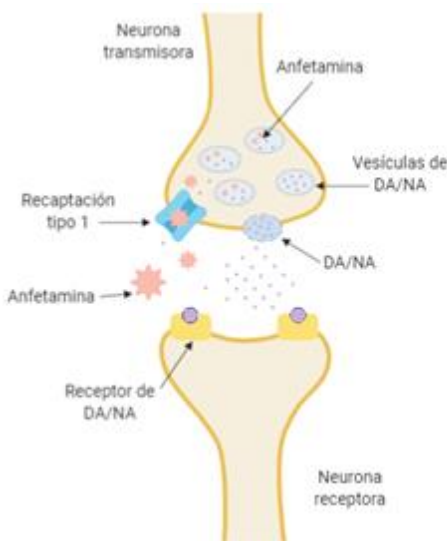


Figura 13. Mecanismo de las anfetaminas (Robledo, 2008)

Algunos efectos ocasionados por el consumo de anfetaminas

- A. Aumento de atención y reducción de fatiga
- B. Aumento de actividad física
- C. Disminución del apetito y del sueño
- D. Sensación de euforia
- E. Aumento de la frecuencia respiratoria
- F. Latidos cardiacos rápidos o irregulares
- G. Hipertermia

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas anfetaminas.

Nombre	Anfetaminas
Fórmula	$C_9H_{13}N$.
Peso molecular	135.20 g/mol
Apariencia a temperatura ambiente	Se pueden presentar incoloras o amarillentas, en forma de polvo blanco, en tabletas
Solubilidad	Poco en agua Alcohol, éter, en ácidos y cloroformo
pH	10.1 (base débil)

1.4. Pruebas de identificación

La variedad de sustancias que pueden encontrarse en el laboratorio de toxicología es muy amplia, por lo que se deben identificar y, si es necesario, cuantificar agentes farmacéuticos, drogas ilícitas, gases, solventes etc. en fluidos biológicos (Moffat, et al., 2011). En el caso de la identificación de drogas ilícitas en fluidos biológicos se recurre una diversidad de pruebas, las cuales pueden ser cualitativas, semicuantitativas o cuantitativas.

Algunas pruebas para la identificación son: Inmunoensayos (IA), Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia (FPIA), Técnica de Inmunoensayo Enzimático Múltiple (EMIT), Radioinmunoensayo (RIA) y Inmunoensayo Absorbente Ligado a Enzimas (ELISA), los cuales proporcionan resultados cualitativos y rápidos; en algunos casos, resultados semicuantitativos. Sin embargo, en los últimos años, los laboratorios más grandes han tenido la necesidad de emplear la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para la identificación de compuestos de una manera más específica y precisa, proporcionando resultados cuantitativos, (Moffat, et al., 2011).

1.5. Inmunoensayo

Los análisis que se realizan mediante enlace requieren de la participación de dos sustancias: una que tenga la función de ligador y la otra como ligando, la cual también es identificada como analito. La medición del analito se caracteriza por su capacidad de saturar a su ligador específico, y posteriormente la determinación de las fracciones libres y unida al ligando. Este fundamento puede llevarse a cabo mediante diferentes ligadores y diferentes métodos para determinar la relación entre las fracciones libre y unida. Los inmunoensayos son los métodos que se realizan por medio de enlace, en los que el ligador es un anticuerpo (Auriostigue, 2014).

La forma de conocer la proporción de las fracciones libre y unida resultantes, es empleando una marca ya sea en el ligador o en el ligando, lo cual permite la cuantificación después de lograr la separación de las fracciones. Se entiende por marca la incorporación de un elemento, molécula o partícula que pueda ser

cuantificada por un método analítico sensible; tales como isótopos radioactivos (Radioinmunoanálisis, RIA), compuestos fluorescentes (Fluoroimunoanálisis, FIA), enzimas (Enzimoimunoanálisis, EIA), átomos metálicos y radicales libres (Auriostigue, 2014).

Los inmunoensayos requieren de un antígeno y anticuerpo para que se lleve a cabo la reacción inmunológica, el fundamento del análisis consiste en la producción de un enlace específico entre un antígeno con su anticuerpo correspondiente, generando un complejo, el cual puede diferenciarse del ligando libre (Cruz, 2005). Los inmunoensayos que se han desarrollado y utilizado en diversos campos de investigación y aplicación, y se pueden clasificar como se muestra en la figura 14:

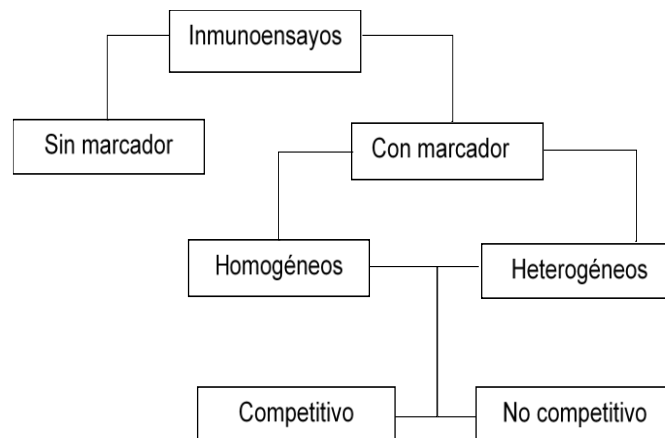


Figura 14. Clasificación de los inmunoensayos (Ishikawa, 1999)

Ishikawa, (1999), describe los inmunoensayos de la siguiente manera

- Primero, se pueden dividir en dos grupos.

El primer grupo no usa marcadores e incluye la inmunodifusión y la nefelometría y, el otro grupo que usa marcadores como radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes y luminiscentes, etc.

- Segundo, los inmunoensayos que usan etiquetas pueden dividirse en dos grupos: inmunoensayos homogéneos y heterogéneos. En los homogéneos, las señales que se pueden correlacionar con la cantidad o concentración de analitos se obtienen directamente de las mezclas de reacción de los reactivos marcados y las muestras que contienen analitos, que no requieren pasos de separación sin límites. Los inmunoensayos heterogéneos requieren pasos de separación libres, pero en general son más sensibles que los homogéneos
- En tercer lugar, los inmunoensayos homogéneos y heterogéneos se pueden dividir en dos grupos: competitivos y no competitivos. En general, emplean reactivos de reacción idénticos, siendo los inmunoensayos no competitivos más sensibles que los competitivos.

Un inmunoensayo competitivo mide la cantidad de antígeno marcado unido al anticuerpo; a medida que la concentración de antígeno marcado y anticuerpo son más bajas, la sensibilidad es mayor; por ende, las concentraciones de antígeno marcado y anticuerpo deben ser altas, con la finalidad de que más del 50% del antígeno marcado y del anticuerpo utilizado estén en forma unida en ausencia del antígeno a medir, por lo que, las afinidades de los anticuerpos utilizados limitan las concentraciones mínimas de antígeno marcado (Ishikawa, 1999).

Engvall y Jonsson (1980) denotan, que los inmunoensayos enzimáticos heterogéneos, que incluyen (ELISA), se basan en los mismos principios que se utilizan en los (RIA). En el inmunoensayo enzimático homogéneo (EMIT), no es necesaria tal separación.

Los inmunoensayos dependen de cuatro componentes básicos, independientemente de la aplicación o de la tecnología subyacente utilizada:

- El antígeno por identificar
- El anticuerpo o antisuero utilizado para el reconocimiento específico del antígeno
- El método para separar el complejo de antígeno-anticuerpo unido de los reactivos no unidos (si el ensayo usado es heterogéneo)

- El método de detección

La eficacia de un inmunoensayo depende de la eficiencia de la formación del complejo antígeno-anticuerpo y la capacidad para detectar dichos complejos (Cruz, 2005).

1.6. Inmunoensayo enzimático y la identificación de drogas en toxicología forense

La toxicología forense es la ciencia que estudia el envenenamiento relacionado con el derecho establecido, y su aplicación a situaciones que pueden tener consecuencias médico legal, con el objetivo de proveer respuestas a las cuestiones que se puedan originar durante investigaciones criminales o procesos judiciales (Madea y Frank, 2004).

La toxicología forense requiere resultados analíticos científicamente indiscutibles y legalmente defendibles, por lo tanto, sus criterios analíticos están basados en normativas y recomendaciones vigentes los cuales son proporcionados por organismos de ámbito internacional y local; y su acatamiento es fundamental para obtener resultados toxicológicos científicamente sólidos e indispensables para proporcionar un dictamen correcto (Martínez, 2016).

El objetivo fundamental de la toxicología *post-mortem* es determinar si el alcohol etílico, las drogas de abuso, medicamentos u otros tóxicos son causantes de la muerte de una persona. Debido a la información que proporciona cada muestra junto con sus dificultades interpretativas como consecuencia de una situación *post-mortem*, podemos priorizar el interés de cada muestra para los estudios químico-toxicológicos de la siguiente forma:

Prioridad 1: muestras de sangre, orina, humor vítreo y contenido gástrico.

Prioridad 2: muestras de bilis, bazo, hígado y riñón.

Prioridad 3: muestras de cerebro, pulmón, cabello y líquido pericárdico.

Acorde a la escala de prioridades de las muestras obtenidas, es de mucha importancia el requerimiento de la matriz de sangre, para que se haga el análisis

de identificación y de cuantificación de los compuestos interesados (Soria y Valverde, 2015). Los barridos toxicológicos se realizan en sangre de cavidad central, ya que es donde los tóxicos van a hallarse más concentrados. Si las concentraciones detectadas en sangre de cavidad central se hallan en rango tóxico, se realiza la cuantificación en sangre periférica para establecer si se trata de un fenómeno de la redistribución *post-mortem* (Hastedt, 2014). La evaluación de tóxicos *post-mortem* deben ser cautelosas, ya que muchos tóxicos son inestables al momento de sufrir degradación bacteriana y metabólica (Robertson y Drummer, 1998).

Los inmunoensayos destinados a la búsqueda de drogas de abuso (opiáceos, cocaína, benzodiazepinas, amfetaminas, entre otros) y algunos fármacos en orina (barbitúricos, dextropropoxifeno, fenciclidina, metadona, ácido lisérgico, antidepresivos tricíclicos) son los de mayor uso en toxicología. También se incluyen aquellos que cuantifican etanol en sangre, el monitoreo de algunas drogas terapéuticas en plasma (ciclosporina, metotrexato, difenilhidantoína, fenobarbital, carbamazepina, ácido valproico, digoxina, teofilina, paracetamol, etc.) (Giannuzzi y Ferrari, 2006).

Pacheco y Martínez, (2010) refieren que los métodos presuntivos más utilizados para detectar drogas de abuso son: Radioinmunoensayos (RIA), Quimioluminiscencia (QL) y la Técnica de inmunoensayo enzimático múltiple (EMIT). Todos ellos se basan en general en los procedimientos inmunoquímicos clásicos y utilizan como principio analítico la reacción antígeno-anticuerpo. Requieren de un complejo antígeno-anticuerpo, donde el antígeno es la droga convenientemente marcada. El ensayo consiste en el desplazamiento competitivo de la droga marcada del complejo antígeno-anticuerpo por la droga libre presente en la muestra analizada. La droga marcada, liberada al medio, se utiliza para determinar la presencia y/o concentración de la droga presente en la muestra problema.

Es posible la detección de distintos fármacos y sus metabolitos en muestras de orina mediante la (EMIT); sin embargo, en ocasiones las muestras de orina no

están disponibles por la descomposición o embalsamamiento del cadáver; por lo tanto, los productos biológicos no son de utilidad, ya que las muestras pueden llegar a estar contaminadas (Vogel y Hodnett, 1981).

1.7. Método EMIT (Técnica de inmunoensayo enzimático múltiple)

El método EMIT se diseñó originalmente para el análisis de muestras de orina; es una técnica fácil, rápida de realizar y automatizada. El anticuerpo marcado reacciona con los glucorónidos de las drogas, por lo tanto, no se requiere de una hidrólisis previa en las muestras de orina, en ocasiones suelen producirse reacciones cruzadas de los anticuerpos empleados en el análisis con moléculas que poseen estructura química similar a la del analito, causando una especificidad menor; por otra parte, es importante considerar que no todos los compuestos de la misma familia tendrán la misma reactividad con el respectivo anticuerpo (Cruz, 2005).

El método EMIT es una de las técnicas con mayor aplicación en el análisis de fármacos o drogas de abuso. Este método se basa en la unión competitiva a proteínas. Por lo que se describe como un inmunoensayo enzimático competitivo homogéneo en el que se mide la absorbancia a 340 nm de la reacción producida por el paso de NAD^+ a NADH, que es el cofactor necesario para que la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa actúe sobre su sustrato, aplicable para cualquier kit de reactivos EMIT (Flores, 2010).

El tipo de reacción que se lleva a cabo en este método es de clase competitiva ya que interactúan el analito de la muestra y el analito conjugado con la enzima en un número limitado de sitios de enlace con el anticuerpo. De manera que se lleva a cabo la reacción de inhibición enzimática por el enlace del anticuerpo al analito conjugado con la enzima, esto se explica debido a que el anticuerpo interfiere estéricamente con la unión del sustrato en el sitio catalítico de la enzima o el enlace del anticuerpo transforma la configuración de la enzima. La concentración de analito en la muestra determina el número de sitios para los anticuerpos disponibles para enlazar e inactivar el analito conjugado con la enzima. A medida que hay más analito hay menos anticuerpo disponible para inhibir la actividad enzimática, por lo que el

cambio de color se observa directamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra (Malkus, et al., 1978).

1.8. Fundamento EMIT

El ensayo EMIT es una técnica de inmunoensayo enzimático homogéneo utilizada para el análisis de un compuesto específico. El ensayo está basado en la competencia entre la droga en la muestra y la droga marcada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) por los sitios de unión de los anticuerpos. La actividad enzimática disminuye al unirse con el anticuerpo, de manera que la concentración de la droga en la muestra puede medirse en función de la actividad enzimática. La enzima activa convierte la nicotinamida adenín dinucleótido (NAD^+) en NADH, lo cual causa una variación de la absorbancia que se mide por espectrofotometría. La G6PDH endógena en el suero no interfiere porque la coenzima NAD^+ funciona solamente con la enzima bacteriana (*Leuconostoc mesenteroides*) utilizada en el ensayo (SIEMENS, 2015).

El fundamento de los inmunoensayos competitivos se representa en la figura 15, en la reacción en donde una droga marcada (Ag^*) con un determinado compuesto, compite con la droga (Ag) a investigar, para unirse a un anticuerpo específico (Ab). La presencia de la droga en el problema se pondrá de manifiesto dado que al unirse al anticuerpo específico desplaza a la droga sin marcar, para que el complejo marcado o inmunocomplejo sea detectado por el EMIT (López, 2013).

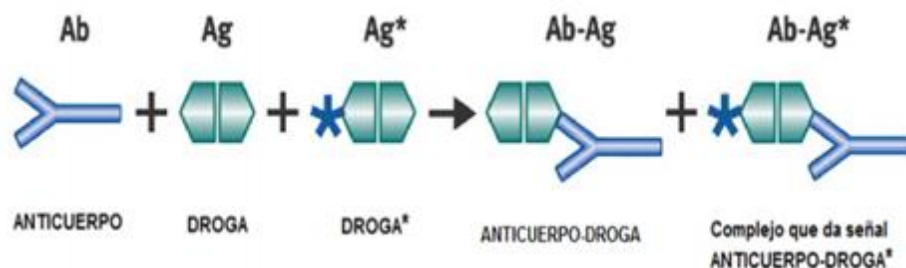


Figura 15. Principio inmunoensayo competitivo (López, 2013).

La cuantificación se hace, de acuerdo con la actividad de la enzima ocupada para marcar. Tras la formación del complejo antígeno-anticuerpo, se añade un sustrato que es catalizado por la enzima transformándose en un compuesto coloreado que permite la lectura de la actividad enzimática con ayuda de un espectrofotómetro. Este análisis de la actividad servirá para calcular la concentración del analito que se necesita identificar. La presencia del anticuerpo y la actividad enzimática es proporcional a cantidad de analito libre. Las enzimas más utilizadas en este ensayo son la malato deshidrogenasa y la 6-fosfato deshidrogenasa, debido a que se ven poco afectadas por los constituyentes del suero de la muestra (Pacheco y Martínez, 2010).

Tabla 7. Datos sobre el EMIT y drogas analizar.

Droga	Tiempo de vida media	Sustancias identificadas por el método
Tetrahidrocannabinol	Fumador: - Moderado (4 veces por semana): 5 días. - Intenso (diario): 5 días. - Crónicos: >20 días	9Δ-THC 11-hidroxi-8Δ-THC 11-hidroxi-9Δ-THC 9-carboxi-11nor-9Δ-THC-gucorónico
Cocaína	2-4 días	Cocaína Ecgonina Benzoilecgonina
Benzodiacepina	3 días si se ingiere dosis terapéutica	Benzodiacepinas Alprazolam Bromzepam Clonazepam Metabolitos 3-hidroxi diazepam (temazepam) y desmetil-3-hidroxi diazepam

Anfetamina	24-48 horas	D-anfetamina D-metanfetamina D,L-anfetamina D,L-metanfetamina L-anfetamina L-metanfetamina Metilenedioxianfetamina (MDA) Metilenedioximetanfetamina (MDMA) Metilenedioxietilamina (MDEA)
------------	-------------	--

1.9. Validación de métodos analíticos

La Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (2016), define un método analítico como la descripción de la secuencia de actividades, recursos, materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra. La validación es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

Los procesos de validación para los métodos analíticos dentro de un laboratorio químico deben de ser sometidos a una evaluación para confirmar que los resultados que emiten son confiables y acorde con el objetivo que debe cumplir el método analítico y a su vez cumplir con la garantía de calidad del laboratorio. Si un método se modifica o se aplica un cambio en su procedimiento (por ejemplo, una muestra de matriz nueva), es necesario que se realice una validación de acuerdo con la modificación realizada. Tal es el caso de un método que es diseñado originalmente para ser empleado en orina y se requiere sustituir por sangre (Anderson, et al., 2010).

El desarrollo y validación de métodos analíticos que permitan identificar drogas de abuso en matrices biológicas es muy importante en toxicología

forense y clínica, la detección de estas drogas por el análisis de muestras de plasma, orina, cabello, meconio, leche materna y otros, pueden ser usadas para identificar y cuantificar sustancias específicas y/o sus productos de biotransformación (Anderson et al., 2010).

Antes de comenzar con el proceso de validación, se deben establecer claramente los requerimientos del método para implantar el alcance de la validación. Se debe tener en cuenta el método a validar y su aplicación, de este modo conocer detalladamente cuál es el analito y la matriz (o matrices) que se emplearán y para qué fines se utilizarán los resultados emitidos por el método validado (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Para validar un método, es muy importante contar con un diseño experimental apropiado, una metodología adecuada y un tratamiento estadístico pertinente que permita analizar los datos obtenidos una vez realizado el experimento. Esta metodología debe ser aplicada a cada uno de los criterios de evaluación contemplados dentro del proceso de validación (Ermer y John, 2005).

Parámetros de desempeño

La Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (2016) propone parámetros bajo los cuales el resultado de una prueba será considerado aceptable. A continuación, se encuentra la definición de los parámetros de desempeño considerados para la validación del método analítico.

- A. **Linealidad:** La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un intervalo dado) para obtener resultados de ensayo que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra. La capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra.
- B. **Precisión:** Mide el grado de acuerdo entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas

en las condiciones previstas en el método. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método.

- C. **Exactitud:** Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.
- D. **Repetibilidad:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos.
- E. **Reproducibilidad:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios. Precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.
- F. **Límite de detección:** Concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.
- G. **Límite de cuantificación:** Concentración mínima del analito que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables. El límite de cuantificación es un parámetro de ensayos cuantitativos para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se utiliza particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación.
- H. **Estabilidad de la muestra:** Propiedad de una muestra preparada de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito después de almacenarse por un tiempo y condiciones determinadas.
- I. **Selectividad:** La selectividad es la capacidad para evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente pueden incluir impurezas, degradantes, matriz, etc.
- J. **Robustez:** Es la medida de la capacidad del método analítico de permanecer inalterado por pequeñas pero deliberadas variaciones (efecto de cambio en las condiciones) en los parámetros del mismo, proporcionando un índice de confiabilidad durante su uso normal.
- K. **Especificidad:** Este parámetro se relaciona con el grado en que otras sustancias interfieren en la identificación y, si procede, en la cuantificación

de los analitos de que se trate. Mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias, (endógenas o exógenas), en una muestra de la matriz en las condiciones exigidas por el método. La especificidad se determina añadiendo materiales que podrían encontrarse en la muestra.

1.10. Parámetros en la validación de inmunoensayos

Anderson et al., (2010) establecieron una guía de validación de métodos analíticos para evaluar y calificar el buen funcionamiento de inmunoensayos; la cual fue publicada por la Oficina de Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (ONUDD). Los parámetros establecidos en esta guía aparecen a continuación:

Especificidad/ selectividad

Este parámetro se relaciona con el grado en que otras sustancias interfieren en la identificación y, si procede, en la cuantificación de los analitos de que se trate. Mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias, endógenas o exógenas, en una muestra de la matriz en las condiciones exigidas por el método.

La utilización del inmunoensayo con matrices biológicas distintas de las ya validadas por el fabricante, por ejemplo, sangre en lugar de orina, exigirá su validación, especialmente en lo que respecta a los efectos de matriz. Para validar un inmunoensayo, analizar en las condiciones establecidas para la prueba:

- 1) Muestras fortificadas con drogas y/o metabolitos fiscalizados del grupo de interés.
- 2) Muestras de drogas fiscalizadas de otras clases.
- 3) Sustancias que por lo común se encuentran en la matriz en que se analiza la droga:
 - a. Al menos 20 especímenes que se sepa que son positivos;
 - b. Al menos 20 especímenes que se sepa que son negativos procedentes de distintas personas

- c. La reactividad con otras drogas o sustancias no debe ser importante.

Límite de detección

Se trata de la concentración mínima de analito que puede ser detectada e identificada con un determinado grado de certidumbre. El límite de detección se define también como la concentración mínima que puede distinguirse del ruido de fondo con un determinado grado de confianza.

Los inmunoensayos comerciales normalmente contienen información sobre este límite. De ser necesaria una validación, por ejemplo, para analizar un nuevo derivado anfetamínico en la misma matriz o para buscar drogas en diferentes matrices, analizar diez réplicas independientes y al azar de especímenes blancos (en ausencia de drogas) añadidos con la droga de interés con distintos niveles de concentración para poder determinar la concentración mínima que puede detectarse con fiabilidad. Debe ser sustancialmente inferior al nivel de concentración fijado como umbral para que puedan clasificarse las muestras como positivas o negativas de una forma fiable.

Precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad

La precisión mide el grado de acuerdo entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método.

- A. La repetibilidad de las condiciones existe cuando el mismo analista analiza muestras el mismo día y con el mismo instrumento o los mismos materiales y en el mismo laboratorio. Cualquier cambio de estas condiciones (por ejemplo, diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos, diferentes laboratorios) implica que las condiciones sólo serán reproducibles.
- B. La precisión normalmente se mide en términos de coeficiente de variación (cv) o desviación típica relativa de los resultados analíticos obtenidos con patrones de control preparados independientemente. La precisión depende

de la concentración y debe medirse con concentraciones diferentes dentro del rango aceptado, normalmente en la parte baja, media y alta de éste. Una precisión aceptable en el nivel inferior de concentración es del 20%. Con concentraciones más altas la precisión debe ser mayor.

El buen funcionamiento de un inmunoensayo con un umbral de concentración definido debe verificarse analizando muestras de control en tandas añadidas con concentraciones próximas al umbral ($\pm 25\%$ del umbral de concentración). La precisión dentro del día (repetibilidad) puede determinarse analizando muestras de control añadidas con una concentración del analito que sea un 25% superior al umbral de concentración. Debe calcularse la Desviación Estándar Relativa (RSD) de estos datos.

La precisión en distintos días (precisión intermedia) puede obtenerse acumulando datos sobre muestras de control añadidas con una concentración del analito que sea un 25% superior al umbral, lo que debe hacerse habitualmente con cada tanda de análisis. Debe calcularse la RSD de estos datos. Para establecer la repetibilidad (precisión dentro del día) y la precisión intermedia (precisión en distintos días), los valores de la RSD deben ser inferiores al $\pm 20\%$.

Estabilidad

En la validación del método se debe contemplar el periodo de tiempo en el que se mantienen estables los analitos durante el procedimiento de evaluación, así mismo su almacenamiento antes y después del análisis. En general, la medición se hace comparando soluciones recién preparadas, a una concentración conocida, con estándares similares, resguardados durante lapsos de tiempo diferente y en diferentes condiciones (Anderson et al., 2010).

La estabilidad para cada tipo de muestra variable. Existen muestras estables, que no necesitan un método de conservación, por ejemplo las uñas y los pelos, hay de estabilidad media, que requieren un medio de conservación, como el humor vítreo, orina o contenido gástrico, y existen otras que son de estabilidad , que exigen

una toma rápida (muy cercana a la hora de la muerte) o métodos específicos de preservación, como la sangre y los tejidos (López, 2013).

1.11. Campo de estudio

La toxicología forense es un área de las ciencias biológicas a la que se recurre para investigar asuntos jurídicos y auxiliado con la aplicación de la ley; es una disciplina donde la toxicología y la química analizan aspectos médico-legal de las investigaciones *post-mortem* a fin de encontrar las causas y condiciones de un hecho. Algunos de los instrumentos analíticos modernos con los que cuenta el laboratorio de toxicología y ayudan en el análisis de indicios son el Infrarrojo, EMIT, cromatografía líquida, entre otros (López, 2013).

1.12. Tipo de muestra y características de la muestra

Palencia y Romero,(2008) mencionan que las muestras biológicas en toxicología forense incluyen sangre, orina, semen, riñón, cerebro, hígado, bilis, contenidos gástricos, intestino, bazo, pulmón, huesos y más recientemente cabello, uñas, saliva y sudor. También son fundamentales en casos de agresión sexual, las muestras de contenido vaginal y/o rectal, así como las prendas íntimas más cercanas o en contacto con estos fluidos, pues permiten situar al sospechoso en el lugar del hecho e identificarlo, a través de la realización de diversos estudios.

Realizar correctamente la selección, recolección y remisión de muestras biológicas para su análisis toxicológico es de gran importancia ya que favorece a la obtención de resultados certeros, que ayudarán en el esclarecimiento e interpretación de los hechos delictivos (López, 2013).

Recolección y almacenamiento de muestra

El examen toxicológico en sangre permite conocer los valores correspondientes al momento en que se recogieron las muestras hasta el momento del accidente o del incidente, determinando así una hipótesis de si el individuo se encuentra bajo el efecto de una droga en el momento que nos interesa y establecer

el posible grado de afección del individuo en el momento del incidente. Los recipientes en donde se coloca la muestra deben ser de polipropileno o similar con cierre hermético, de tapa rosca y sellado con cinta adhesiva. Es fundamental utilizar material nuevo para evitar contaminaciones, puesto que en ocasiones, si son recipientes reutilizados pueden contener restos de medicamentos u otras sustancias que no se eliminan con lavado, provocando interferencias en el estudio analítico (Palencia y Romero, 2008).

En el caso de ser muestra sanguínea debe almacenarse en refrigeración a una temperatura igual o menor a 4°C. El recipiente donde se coloca la muestra debe ser rotulada y sellada correctamente en frente de la persona sometida a examen (en caso de ser persona viva), con datos apropiados mínimos y legibles, donde se observe el hecho correspondiente (identificación de la víctima o juzgado, fiscalía interviniente, fecha, hora de toma de muestra y número de causa) iniciando inmediatamente la cadena de custodia (López, 2013).

Composición de la sangre

Lecuona, et al, (2005) refieren que la sangre es un vehículo ideal para el transporte de materiales; principalmente lleva nutrientes del sistema gastrointestinal a todas las células del cuerpo y desplaza subsecuentemente los productos de desecho de estas células a órganos específicos para su eliminación; también transporta otros metabolitos, hormonas, moléculas de señalamiento entre otras sustancias.

Características de la muestra

Las principales muestras biológicas en las que se realiza búsqueda de drogas de abuso son: sangre, humor vítreo, orina y fragmentos de órganos. Para todas las muestras, es necesario cumplir con los siguientes criterios:

- Documentación: siempre verificar que la etiqueta de la muestra coincida con la cadena de custodia y el oficio que acompaña a la muestra.
- Estado de la muestra: el tiempo transcurrido entre la muerte y la necropsia, las condiciones de la muerte, el estado de salud del occiso (p.ej. hemólisis,

lipemia, sepsis entre otras interferencias), las condiciones del lugar donde se encuentra el cuerpo (p.ej. altas temperaturas, en agua, etc.) y las condiciones del almacenamiento y/o traslado; todos estos pueden ocasionar que la muestra se deteriore.

- Estado del envase que contiene la muestra: el recipiente que contenga a la muestra debe de encontrarse debidamente cerrado y etiquetado a modo de evitar la contaminación de ésta (Palencia y Romero, 2008).

1.2 ANTECEDENTES

El inmunoensayo EMIT se desempeña adecuadamente como un procedimiento de identificación de drogas de abuso en muestras de orina. El inmunoensayo EMIT ofrece un ahorro de tiempo significativo comparado en los procedimientos de TLC (cromatografía en capa fina), HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia), GLC (cromatografía de gases) y LC-MS (cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas) (Cavanagh, et al., 1978).

Investigaciones realizadas con el objetivo de evaluar la especificidad para la identificación de drogas de abuso en orina mediante el método de inmunoensayo EMIT, demostró que al determinar la especificidad de estos ensayos permitirá al analista explicar algunas de las razones por la cual se obtienen resultados falsos positivos en las diferentes drogas analizadas, que de acuerdo a los resultados: la aparición de resultados falsos positivos, se estima que ocurre con una incidencia de 3 a 5%, por lo que los resultados obtenidos por el EMIT son confiables, (Loyd y Lou, 1981).

Malkus et al., (1978) realizaron una modificación en la metodología del inmunoensayo EMIT con el objetivo de analizar drogas en muestras de sangre de voluntarios sanos, se compararon los resultados obtenidos contra el método de cromatografía de líquidos en el cual se obtuvo un coeficiente de correlación satisfactorio de 0.96, a su vez, se utilizó el EMIT frente al método de cromatografía de líquidos/gases en el que se determinó un coeficiente de correlación de 0.88, estos resultados indican una buena precisión para los tres métodos mencionados.

Michael Asselin, et al, (1988) realizaron un extracto metanólico con el objetivo de analizar sangre hemolizada a través del inmunoensayo enzimático EMIT, este método aportó una ventaja considerable respecto a la precisión comprada con otros métodos cuantitativos, estos hallazgos sugieren que el EMIT puede extenderse hasta el área de toxicología donde se encuentran muestras de sangre hemolizada, que son disponibles en el ámbito forense. A su vez, Lewellen y McCurdy (1988) y Gjerde et al., (1990) realizaron un análisis en muestras de sangre postmortem a través del inmunoensayo EMIT; los resultados demostraron la aplicación exitosa de

este método, que además tiene la sensibilidad necesaria de identificar drogas en muestras de sangre hemolizada, esto tiene un significado especial, en aquellos casos en que la sangre es el único espécimen enviado para el análisis.

Bogusz, et al, (1990) realizaron un análisis comparativo entre inmunoensayos EMIT y FPIA mediante extracción cetónica en sangre, donde obtuvieron que ambos métodos mostraron sensibilidad y precisión comparables en el caso de determinación de barbitúricos, benzodiazepinas y metabolitos de cocaína en estándares preparados a partir de sangre. La comparación ha mostrado que la prueba FPIA fue mucho más sensible, sin embargo, para las pruebas de metabolitos de cocaína, opiáceos, cannabinoides y benzodiazepinas utilizadas para las muestras de sangre fueron notablemente más altas en un 15% en el ensayo EMIT.

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, la Secretaría de Salud reportó que de la población total de entre 12 a 65 años, el 9.9% ha consumido drogas ilegales alguna vez en la vida (15.8% hombres y 4.3% mujeres) y la edad promedio de inicio de consumo de drogas en hombres es de 17.7 y en mujeres de 18.2 (Secretaría de Salud, 2016).

Como se observa, el consumo de alguna sustancia de abuso constituye uno de los problemas más complejos de salud pública, ya que es perjudicial hasta el punto de que podrían necesitar tratamiento o causar la muerte. Este fenómeno es de gran relevancia puesto que es un patrón de comportamiento que tiene un importante efecto negativo sobre la salud y el bienestar de las personas que participan en ella y de su familia, produciendo una sustancial discapacidad y pérdida de la vida. De acuerdo con la OMS, en 2015 fallecieron aproximadamente 450,000 personas a consecuencia del consumo de drogas, de esas 167,750 estaban directamente relacionadas con los trastornos por consumo de drogas, principalmente sobredosis.

El inmunoensayo enzimático EMIT tiene como objetivo identificar drogas en orina. Investigaciones realizadas por Cavanagh, et al., (1978) y Loyd & Lou (1981) demostraron que el método tiene un buen desempeño para la identificación de drogas de abuso; reportaron que la incidencia con la que se presentan falsos positivos es del 3 al 5% de las muestras, lo cual indica que los resultados son satisfactorios y confiables. Además, documentaron que el inmunoensayo EMIT es más rápido en comparación con otros métodos analíticos confirmatorios como el TLC (cromatografía líquida en capa fina) y GLC (cromatografía de gases).

El uso creciente del inmunoensayo EMIT ha permitido que investigadores como Malkus et al., (1978), Michael, et al., (1988), Lewellen y McCurdy (1988), Gjerde *et al.*, (1990) y Bogusz, et al., (1990) busquen resultados confiables en matrices diferentes a la orina; en este sentido, tales investigadores realizaron estudios empleando sangre como muestra principal donde se obtuvo una precisión ubicada dentro de los parámetros de confiabilidad. La importancia de identificar la presencia de drogas de abuso como lo son: tetrahidrocannabinol, cocaína,

benzodiazepinas y anfetaminas en muestras de sangre por inmunoensayo enzimático EMIT, permite brindar información si al momento de su muerte la persona se encontraba bajo el efecto de alguna droga, proporcionando resultados confiables para una causa legal que repercute directamente en la sociedad.

1.4 JUSTIFICACIÓN

A partir de 1970 investigadores del ámbito forense buscaron técnicas alternativas a los métodos cromatográficos y espectroscópicos tradicionales para realizar el tamizado de drogas de abuso, en las que seleccionaron las pruebas inmunoenzimáticas, puesto que dichas técnicas demuestran tener buena sensibilidad, son rápidas y fáciles de realizar, reactivos de vida media prolongada y son económicas. Algunas de estas técnicas, han sido desarrolladas para su análisis en orina, lo cual genera inconvenientes para el análisis toxicológico *post-mortem*, ya que en su mayoría se proporciona muestra sanguínea. Estas circunstancias han llevado a adaptar los métodos de inmunoensayo, que fueron diseñados principalmente para la orina, a la detección de drogas en otros fluidos y tejidos corporales.

En el Laboratorio de Toxicología Forense del Estado de México existe la necesidad de contar con un método de identificación de drogas de abuso en muestras *post-mortem*, especialmente en muestra sanguínea, el método empleado para el desarrollo de la prueba de antidoping es el inmunoensayo enzimático EMIT que originalmente se desarrolló para identificar drogas en orina, por lo que se pretende validar para el análisis de drogas en sangre.

1.5 HIPÓTESIS

El inmunoensayo enzimático EMIT, técnica validada para la identificación de drogas de abuso (tetrahidrocannabinol, cocaína, benzodiazepinas y anfetamina) en muestra de orina, puede ser utilizada en una matriz alternativa como la sangre, tomada *post-mortem*, cumpliendo con los parámetros de desempeño de validación de métodos analíticos de acuerdo a los criterios establecidos en la guía UNODC, ONU, 2010.

1.6 OBJETIVOS

General

Adequar y validar el inmunoensayo EMIT, desarrollado para la identificación de drogas de abuso (benzodiazepinas, tetrahidrocanabinol, anfetamina y cocaína) en orina, para usarlo en muestras de sangre, *post-mortem*.

Específicos

1. Indagar las condiciones de tratamiento de la muestra sanguínea para su análisis confiable.
2. Realizar la determinación de los parámetros de validación de acuerdo con lo establecido por las "Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos de la Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito" y verificar el cumplimiento de los criterios de aceptación.
3. Elaborar un procedimiento normalizado para la determinación de cada compuesto en estudio, empleando la técnica del inmunoensayo enzimático EMIT.
4. Probar el método validado, en casos de intoxicación real para su verificación.

2. MATERIALES Y MÉTODO

2.1. Materiales, reactivos y equipos

Reactivos

- Kit Reactivo de ensayo Emit® II Plus Benzodiazepines assay.
- Kit Reactivo de ensayo Emit® II Plus THC assay.
- Kit Reactivo de ensayo Emit® II Plus Cocaine assay.
- Kit Reactivo de ensayo Emit® II Plus amphetamines assay.
- HCl 0.1 N.
- Solución de lavado.
- Agua bidestilada.
- Solución control de THC
- Solución control de benzodiazepinas
- Solución control de cocaína
- Solución control anfetaminas
- Calibradores
 - Calibrador nivel 0 Emit® II Plus.
 - Calibrador nivel 1 Emit® II Plus.
 - Calibrador nivel 2 Emit® II Plus.
 - Calibrador nivel 3 Emit® II Plus.
 - Calibrador nivel 4 Emit® II Plus.
 - Calibrador nivel 5 Emit® II Plus.

Muestra

- Muestra biológica sangre (plasma)

Material

- Micropipeta de 100 a 1000 μ l
- Micropipeta de 10 a 100 μ l
- Puntas para micropipeta
- Tubos de ensayo de rosca con tapa
- Gradilla
- Cubetas de plástico para muestra Emit®
- Equipo de protección personal
- Material volumétrico (grado A)
- Equipos e instrumentos
 - Equipo Viva-Twin® (Equipo mediante el cual se lleva a cabo el método de inmunoensayo EMIT)
 - Centrífuga

2.2. Obtención de la muestra

Al laboratorio se remiten las muestras tomadas por el médico legista, de las cuales se eligieron muestras de sangre diferentes que, de acuerdo con su historial (broncoaspiración, patología cardíaca, cirrosis, etc.) se encontraban libres de las drogas a determinar.

Para obtener el plasma, se agitó la muestra cuidadosamente para homogenizarla. Se separó colocando 2 mL de sangre en un tubo de ensaye de rosca. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, (figura 16). Se tomaron 100 μ L del sobrenadante y se transfirió a una cubeta para su análisis en el equipo Viva-Twin [®], de esta manera se corroboró la ausencia de las drogas a determinar, en dichas muestras.



Figura 16. Obtención del plasma.

2.3 Tratamiento de la muestra

Al rectificarse que las muestras de sangre son negativas, se continuó con la fortificación de la muestra (sangre) con soluciones estándar y/o controles, se dejó reposar la muestra fortificada durante un periodo de 24 horas en refrigeración a una

temperatura de 4°C, permitiendo la interacción entre analito y matriz. Posteriormente para su análisis se obtuvo el plasma como se indicó en el inciso 2.2.

2.4 Calibración del equipo

La calibración del equipo se realizó mediante una curva de calibración que se efectúa cada 15 días, de acuerdo con lo establecido por el proveedor.

Se emplearon calibradores nivel 0,1,2,3,4 y 5. Se colocaron 200µL de cada calibrador en 6 cubetas de plástico para Emit® por separado. Se continuó con el procedimiento del equipo:

A) Solicitud de muestras: se indica como tipo de muestra “CALIBRAR” y se selecciona la opción “qAmphetamines, qBenzodiazepine, qCocaine y qTHC 50”, como lo indica la figura 17.

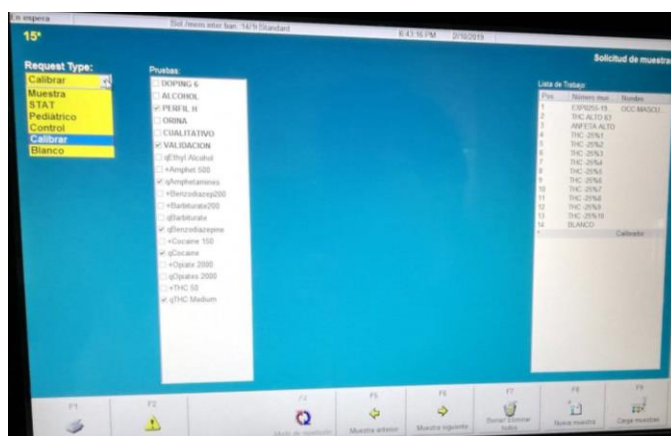


Figura 17. Selección de pruebas para la calibración.

B) Cargar muestras: en automático el programa indica que se deben de colocar las 6 cubetas: nivel 0,1,2,3,4 y 5 Oprimir el botón “ENTER” para que el software asigne la posición y colocar las cubetas, (figura 18).

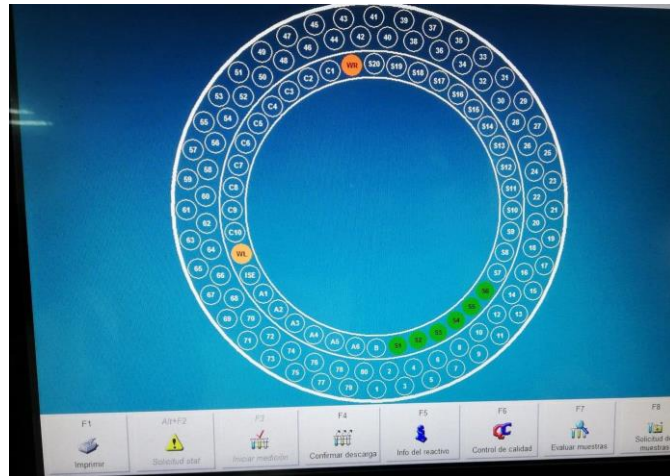


Figura 18. Posiciones en que se colocan las cubetas.

El equipo puede analizar un total de 80 muestras consecutivas.

C) Medición: esperar a que el equipo concluya el análisis. De ser calibrado satisfactoriamente aceptar la calibración, (figura 19).



Figura 19. Aprobación de curva de calibración.

A) Medición de controles

- Se usaron los calibradores 2 y 3, se dispusieron 200 μ L de cada calibrador en cubetas de plástico.
- Se realiza el análisis diariamente de los siguientes controles como lo indica la figura 20, para discriminar variaciones del $\pm 20\%$ de los valores del punto de corte.

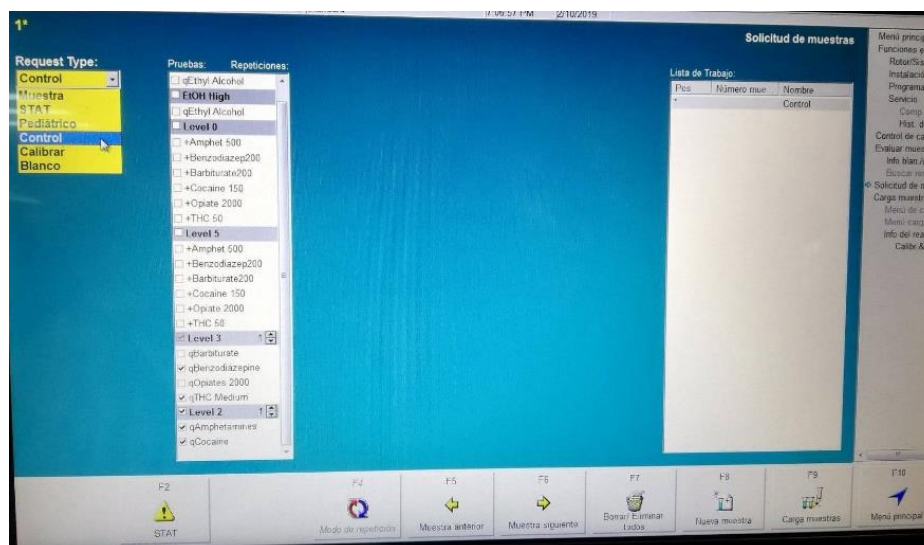


Figura 20. Selección de pruebas para el análisis de controles.

Tabla 8. Valores de los calibradores 1 y 2.

Droga	Calibrador/control nivel 2 (ng/mL)	Calibrador/control nivel 3 (ng/mL)	$\pm 20\%$ de los valores del punto de corte. (ng/mL)
THC	20	50	40-60
Cocaína	150	300	120-180
Benzodiazepinas	100	200	160-240
Anfetaminas	500	1000	400-600

(Los valores resaltados representan los puntos de corte)

- Cargar muestras: oprimir el botón “ENTER” para que el software asigne la posición y colocar las cubetas.

- Iniciar medición: esperar a que el equipo concluya el análisis. Se verifica que ambos controles se encuentren dentro de su rango establecido, (figura 21).

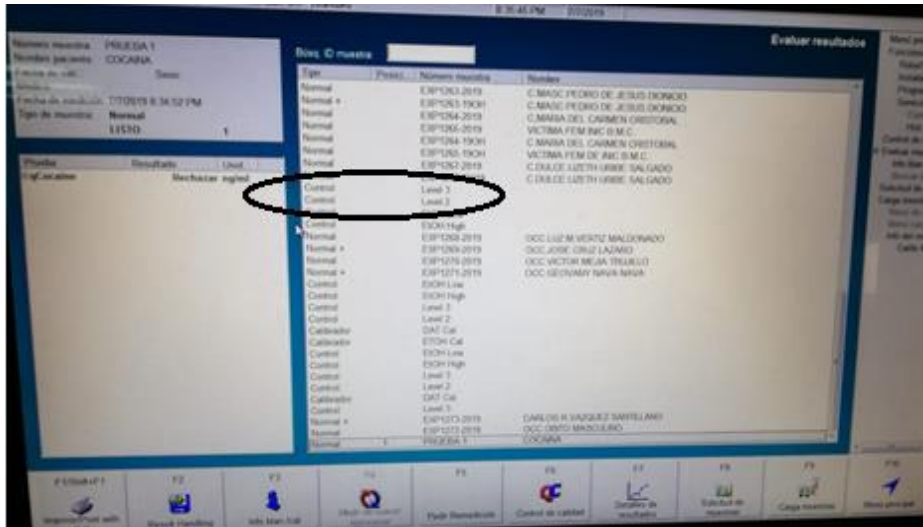


Figura 21. Lectura de controles.

- En caso de que los controles se encuentren fuera del intervalo establecido para cada parámetro ($\pm 20\%$ del punto de corte), repetir la misma operación del punto de medición de controles.

B) VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Ingreso de muestras al equipo

- El análisis de las muestras se llevó a cabo de la siguiente forma (figura 22):
 - En el panel de solicitud de muestras: Se seleccionó la opción “MUESTRA”, selección del parámetro de interés (qBenzodiacepianas, qTHC, qCocaína, qAnfetaminas.)

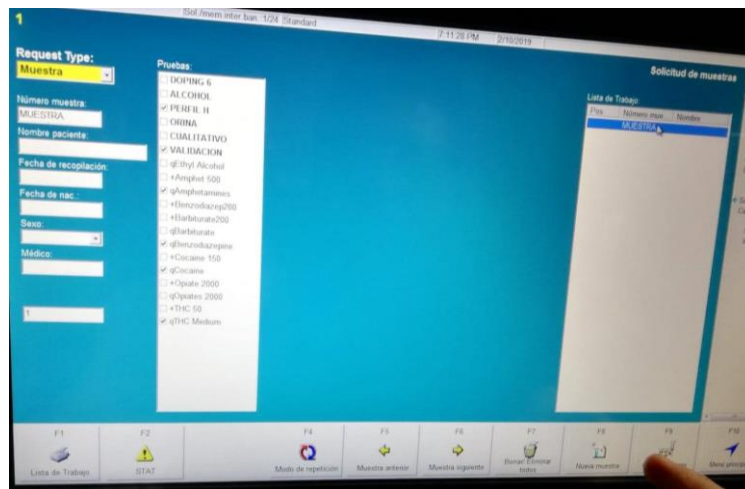


Figura 22. Registro de la muestra en el equipo.

- Presionar en nueva muestra para agregar otra muestra para analizar.
- Dar click en cargar muestras: oprimir el botón “ENTER” para que el software asigne la posición y colocar las cubetas (figura 23).



Figura 23. Posiciones de cubetas en el rotor y en el software

- Presionar iniciar medición: esperar a que el equipo concluya el análisis para visualizar el resultado en la pantalla “EVALUAR MUESTRA”.

1) Determinación de la especificidad/selectividad

1. Se tomaron 20 muestras de sangre, que de acuerdo con su historial se encuentran libres de las drogas de interés (al menos 8 a 10 mililitros por muestra).
2. Se colocó la mitad del volumen de las 20 muestras anteriores y se fortificaron con cada una de las drogas de interés utilizando las soluciones de concentración conocida de drogas de referencia, para alcanzar una concentración aproximadamente al doble del punto de corte para cada una de las mismas, para asegurar el valor positivo.

Se toma cada una de las 20 muestras y se fortificaron con las soluciones de drogas de referencia que se describen a continuación:

- a. 70 μ L de una solución de 25,000 ng/mL de Clonazepam obteniendo una concentración de 400 ng/mL.

- b. 1 mL de una solución de 500 ng/ml de una muestra de control interno de THC, obteniendo una concentración de 100ng/mL.
 - c. 150 µL de una solución de 10,000 ng/mL de cocaína, obteniendo una concentración de 300 ng/mL.
 - d. 500 µL de una solución de 10,000 ng/mL de D-metanfetamina, obteniendo una concentración de 1000ng/mL.
 - e. Se aforó a 5 mililitros con sangre blanca (en ausencia de drogas).
 - f. Se dejó reposar en un lapso de 24 horas en refrigeración a 4°C.
 - g. Se realizó la “obtención del plasma”.
3. Los 20 especímenes blanco (ausentes de drogas) se analizaron a la par de los 20 especímenes fortificados mencionados anteriormente.
 4. Se recolectaron los resultados en un archivo de Excel, para su análisis estadístico.

2) Límite de detección

El software del equipo por configuración maneja un límite de detección inferior diferente para cada droga

1. Se tomaron 12 muestras de sangre, que de acuerdo con su historial se encuentran libres de las drogas de interés (al menos 10 mL por cada muestra).
2. Se tomaron dos valores abajo del punto de corte para cada droga para identificar que los valores por debajo del punto de corte que lee el equipo son confiables.
3. Se realizó la fortificación (24 horas) de la muestra tomando los siguientes valores de la tabla 9.

Tabla 9. Preparación de soluciones para determinar límite de detección

THC	
Nivel superior	Nivel inferior
Se tomaron 350 μ L de una solución de 500 ng/mL de una muestra de control interno de THC y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 35 ng/mL.	Se tomaron 100 μ L de una solución de 500 ng/mL de una muestra de control interno de THC y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 10 ng/mL.
Cocaína	
Nivel superior	Nivel inferior
Se tomaron 50 μ L de una solución de 10,000 ng/mL de Cocaína y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 100 ng/mL.	Se tomaron 15 μ L de una solución de 10,000 ng/mL de Cocaína y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 30 ng/mL.
Benzodiacepinas	
Nivel superior	Nivel inferior
Se tomaron 100 μ L de una solución de 2,500 ng/mL de Clonazepam y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 50 ng/mL.	Se tomaron 20 μ L de una solución de 2,500 ng/mL de Clonazepam y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 10 ng/mL.
Anfetaminas	
Nivel superior	Nivel inferior
Se toman 230 μ L de una solución de 10,000 ng/mL de Anfetamina y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 460 ng/mL.	Se toman 175 μ L de una solución de 10,000 ng/mL de Anfetamina y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 350 ng/mL.

4. Se obtuvo el plasma.

5. Se procedió al ingreso de muestras al equipo.

6. Se recolectaron los resultados en un archivo de Excel, para su análisis estadístico.

3) Precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad

1. Se tomaron 10 muestras de sangre, que de acuerdo con su historial se encuentran libres de las drogas de interés (al menos 10 mL por muestra).
2. En el desarrollo de este parámetro se tomó en cuenta el $\pm 25\%$ respecto al valor del punto de corte dependiendo de cada droga, donde se analiza un nivel con el -25% del punto de corte y un nivel $+25\%$ del punto de corte, se analizaron 10 muestras por nivel por 2 días consecutivos, como lo indica la tabla 10.

Tabla 10. Punto de corte de cada droga $\pm 25\%$.

	-25% (ng/mL)	Punto de corte (ng/mL)	+25% (ng/mL)
THC	37.5	50	62.5
Cocaína	112.5	150	187.5
Benzodiacepinas	150	200	250
Anfetaminas	375	500	625

3. Se realizó la fortificación (24 horas) de la muestra tomando los siguientes valores de la tabla 11.

Tabla 11. Preparación de soluciones para determinar la precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

THC	
Nivel superior	Nivel inferior
Se tomaron 312 μ L de una solución de 1000 ng/mL de una muestra de control interno de THC y se aforó a 5 mL de sangre blanco, para obtener un valor de 62.5 ng/mL.	Se tomaron 187 μ L de una solución de 1000 ng/mL de una muestra de control interno de THC y se aforó a 5 mL de sangre blanco, para obtener un valor de 37.5 ng/mL.
Cocaína	
Nivel superior	Nivel inferior
Se tomaron 460 μ L de una solución de 2,000 ng/mL de Cocaína y se aforó a 5 mL de sangre blanco, para obtener un valor de 187.5 ng/mL.	Se tomaron 281 μ L de una solución de 2,000 ng/mL de Cocaína y se aforó a 5 mL de sangre blanco, para obtener un valor de 112.5 ng/mL.
Benzodiazepinas	
Nivel superior -25%	Nivel inferior +25%
Se tomaron 500 μ L de una solución de 2,500 ng/mL de Clonazepam y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 250 ng/mL.	Se tomaron 300 μ L de una solución de 2,500 ng/mL de Clonazepam y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 150 ng/mL.
Anfetaminas	
Nivel superior	Nivel inferior
Se tomaron 312 μ L de una solución de 10,000 ng/mL de Anfetamina y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 625 ng/mL.	Se tomaron 187 μ L de una solución de 10,000 ng/mL de Anfetamina y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 375 ng/mL.

4. Se obtuvo el plasma
5. Se procedió al ingreso de muestras al equipo.

6. Se recolectaron los resultados en un archivo de Excel, para su análisis estadístico.
7. El plasma restante se resguardó hasta el final de la evaluación de los parámetros.

4) Estabilidad de la muestra

1. Se tomaron 10 muestras de sangre, que de acuerdo con su historial se encuentran libres de las drogas de interés (al menos 10 mL por muestra).
2. En el desarrollo de este parámetro se tomó en cuenta el $\pm 25\%$ respecto al valor del punto de corte dependiendo de cada droga, donde se analiza un nivel con el -25% del punto de corte y un nivel $+25\%$ del punto de corte, se analizaron 10 muestras por nivel por 3 días consecutivos, posteriormente se hizo otra medición al séptimo día, como lo indica la tabla 12.

Tabla 12. Punto de corte $\pm 25\%$

	-25% (ng/mL)	Punto de corte (ng/mL)	+25% (ng/mL)
THC	37.5	50	62.5
Cocaína	112.5	150	187.5
Benzodiazepinas	150	200	250
Anfetaminas	375	500	625

3. Se realizó la fortificación (24 horas) de la muestra tomando los siguientes valores de la tabla 13.

Tabla 13. Preparación del parámetro estabilidad de la muestra.

THC	
Nivel superior	Nivel inferior
Se tomaron 312 μL de una solución de 1000 ng/mL de una muestra de control interno de THC y se aforó a 5	Se tomaron 187 μL de una solución de 1000 ng/mL de una muestra de control interno de THC y se aforó a 5

mL de sangre blanco, para obtener un valor de 62.5 ng/mL.	mL de sangre blanco, para obtener un valor de 37.5 ng/mL.
Cocaína	
Nivel superior	Nivel inferior
Se tomaron 460 µL de una solución de 2,000 ng/mL de Cocaína y se aforó a 5 mL de sangre blanco, para obtener un valor de 187.5 ng/mL.	Se tomaron 281 µL de una solución de 2,000 ng/mL de Cocaína y se aforó a 5 mL de sangre blanco, para obtener un valor de 112.5 ng/mL.
Benzodiazepinas	
Nivel superior -25%	Nivel inferior +25%
Se tomaron 500 µL de una solución de 2,500 ng/mL de Clonazepam y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 250 ng/mL.	Se tomaron 300 µL de una solución de 2,500 ng/mL de Clonazepam y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 150 ng/mL.
Anfetaminas	
Nivel superior	Nivel inferior
Se tomaron 312 µL de una solución de 10,000 ng/mL de Anfetamina y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 625 ng/mL.	Se tomaron 187 µL de una solución de 10,000 ng/mL de Anfetamina y se aforó a 5 mL con sangre blanco, para obtener un valor de 375 ng/mL.

4. Se obtuvo el plasma.
5. Se procedió al ingreso de muestras al equipo.
6. Se recolectaron los resultados en un archivo de Excel, para su análisis estadístico.
7. El plasma restante se resguardó hasta el final de la evaluación de los parámetros.

Nota: dependiendo de la estabilidad de las muestras se tomará en cuenta o no el día siguiente o séptimo día.

5) Calibración del equipo con muestra fortificada.

1. Se tomaron 5 muestras de sangre, que de acuerdo con su historial se encuentran libres de las drogas de interés (al menos 10 mL por muestra).
2. En el desarrollo de este apartado se tomó en cuenta los distintos puntos establecidos por el equipo para llevar a cabo una curva de calibración para cada droga, se analizó cada curva de calibración por triplicado.

Tabla 14. Concentraciones en ng/mL de los compuestos para la calibración.

	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5
THC	0	20	50	100	----
Cocaína	0	150	300	500	1000
Benzodiazepinas	0	100	200	300	1000
Anfetaminas	3000	500	1000	2000	----

3. Se obtuvo el plasma.
4. Se procedió al ingreso de muestras al equipo.
5. Al obtener las curvas de calibración, se determinó si pasan o no pasan la calibración, se corroboró con el análisis de una solución estándar.
6. En caso de que la calibración fuera exitosa para cada una de las drogas se prosiguió con el análisis de casos reales.

6) Análisis de casos reales.

Posteriormente del desarrollo de validación, se evaluaron 10 muestras aleatorias para comprobar el desempeño del método de acuerdo con los criterios de la validación. Al laboratorio llegaron las muestras tomadas por el médico legista.

1. Se verificó que los datos anotados en la cadena de custodia correspondan a los datos registrados que se encuentran en la etiqueta del frasco que contiene la muestra.
2. Se agitó la muestra cuidadosamente para homogenizarla.
3. Se separó colocando 2 mL de sangre en un tubo de ensaye de rosca. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos.
4. Se procedió al ingreso de muestras al equipo.
5. Se analizaron los resultados y se compararon con su expediente forense.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Resultados de las calibraciones realizadas cada 15 días

Primera calibración.

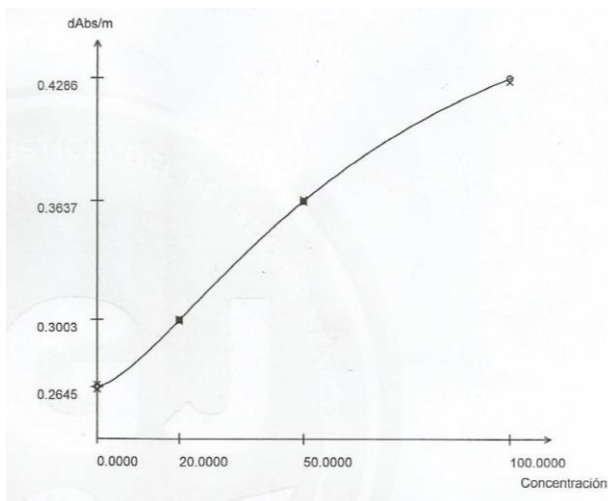


Figura 24. Verificación de la primera curva de calibración de THC

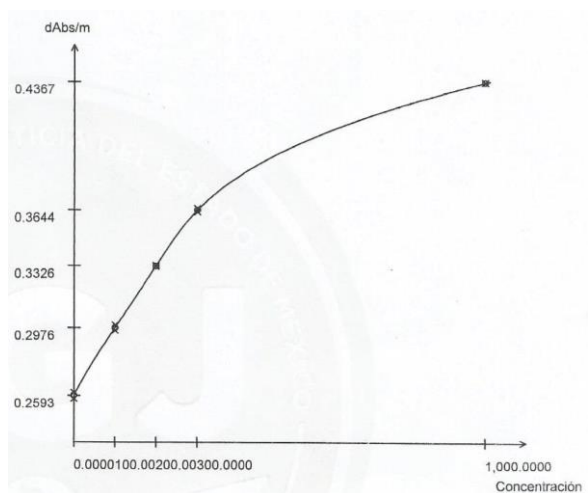


Figura 25. Verificación de la primera curva de calibración de benzodiazepinas

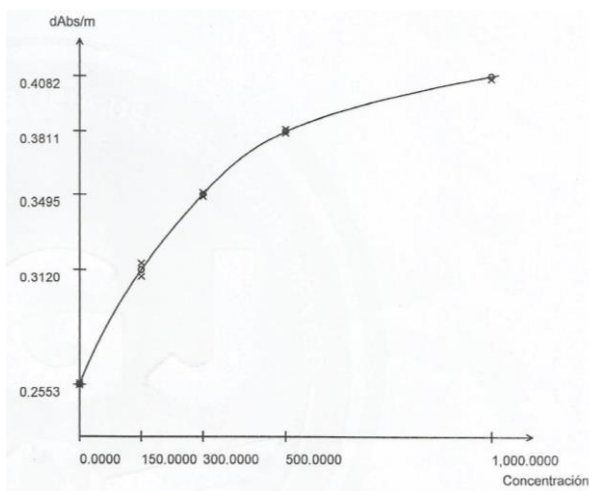


Figura 26. Verificación de la primera curva de calibración de Cocaína

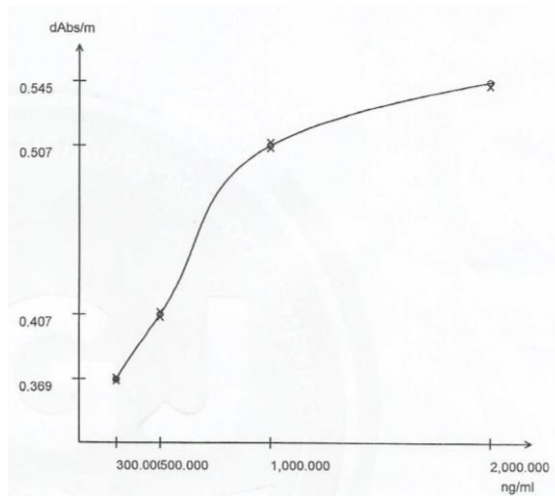


Figura 27. Verificación de la primera curva de calibración de Anfetamina.

Segunda calibración

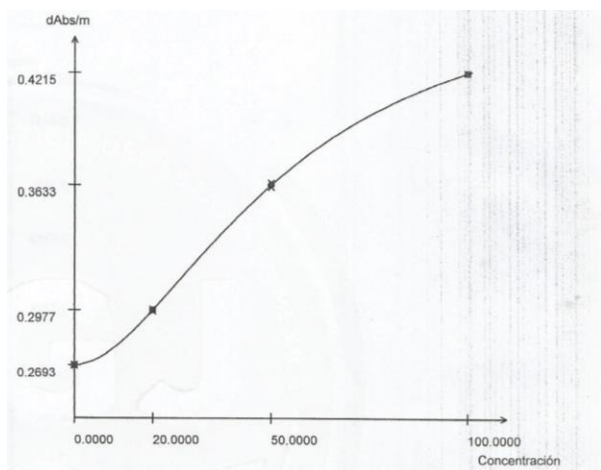


Figura 28. Verificación de la segunda curva de calibración de THC

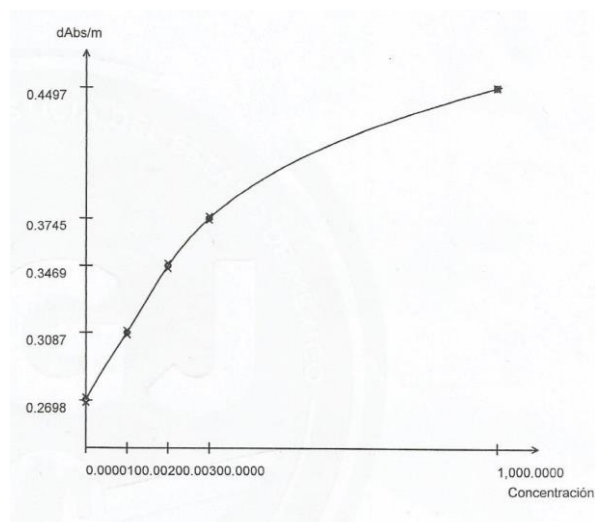


Figura 29. Verificación de la primera curva de calibración de benzodiazepinas

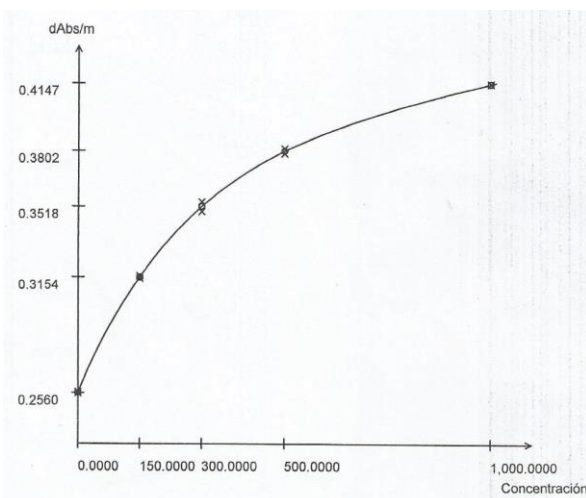


Figura 30 Verificación de la segunda curva de calibración de Cocaína

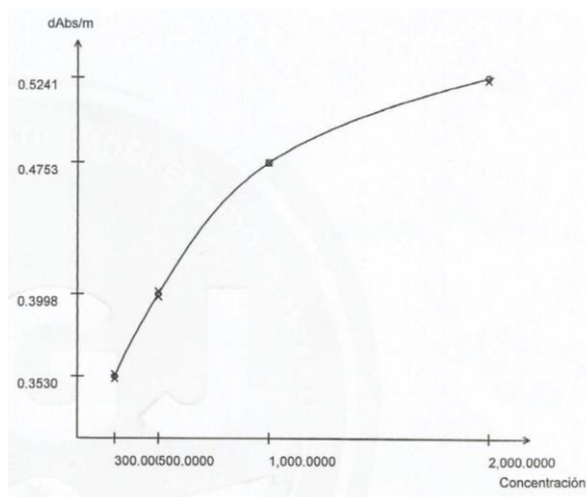


Figura 31. Verificación de la segunda curva de calibración de Anfetamina.

Resultados de controles

Antes de iniciar con las determinaciones se analizan controles. Los resultados obtenidos por día de análisis de cada parámetro se muestran en la tabla 15. En donde se observa que todos los valores no tienen variaciones mayores al 20%.

Tabla 15. Resultados de los controles analizados por día.

Droga	Día						Rango ($\pm 20\%$)
	1	2	3	4	5	6	
THC (ng/mL)	53	52	58	50	57	56	40-60
Cocaína (ng/mL)	148	169	149	160	150	136	120-180
Benzodiazepinas (ng/mL)	212	218	204	189	212	196	160-240
Anfetaminas (ng/mL)	450	403	508	589	543	500	400-600

ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD

Tabla 16. Especificidad con concentración alta probada para cada compuesto de 20 muestras fortificadas.

	ESPECIFICIDAD POSITIVO			
	THC 100 ng/mL	COCAINA 300 ng/mL	BENZODIACEPINAS 400 ng/mL	ANFETAMINA 1000 ng/mL
1	101	367	350	947
2	101	319	360	988
3	92	299	347	987
4	100	320	364	1016
5	100	335	342	1023
6	94	303	357	1042
7	90	341	354	1023
8	83	287	383	881
9	87	299	374	894
10	95	328	409	973
11	86	305	359	975
12	81	315	385	955
13	83	275	390	939
14	87	330	386	974
15	86	335	368	944
16	83	323	357	944
17	87	311	400	941
18	84	320	404	1021
19	79	289	311	898
20	69	265	338	911
PROMEDIO	88.4	313.3	366.9	963.8
DS	8.3376	24.0375	24.6275	46.8386
CV (%)	9.4317	7.6723	6.7123	4.8598

Para la evaluación del parámetro de especificidad de valores positivos, los resultados obtenidos se encuentran cercanos a la concentración esperada (el doble del punto de corte) para THC de 100 ng/mL, en un intervalo de concentraciones entre (69 a 101 ng/mL) y un CV de 9.4%, para benzodiazepinas de 200 ng/mL, con un rango de concentraciones entre (311 a 409 ng/mL) y con un CV de 6.71%, para cocaína corresponde a 300 ng/mL con margen de concentraciones de (265 a 377 ng/mL) con un CV de 7.67% y para anfetaminas de 1000 ng/mL con un intervalo de

concentraciones entre (881 a 1042 ng/mL) con un CV de 4.85%, por lo que se puede inferir que durante el periodo de fortificación no se presentaron reacciones que puedan alterar los resultados entre los componentes de la muestra (sangre) y la solución estándar que puede provocar una alteración en los resultados, de tal manera los valores obtenidos se mantienen constantes y sin variaciones significativas, por lo tanto, al obtener un CV menor al 20% el cumplimiento de estas condiciones atribuye que los resultados obtenidos por arriba del punto de corte (positivos) son confiables así como refiere (Loyd y Lou, 1981), por lo que se cumple el criterio de aceptación para especificidad establecido por la guía (Anderson et al., 2010).

Tabla 17. Especificidad de las 20 muestras sin fortificar.

	ESPECIFICIDAD NEGATIVO			
	THC	COCAINA	BENZODIACEPINAS	ANFETAMINA
1	<10	<35	<15	<325
2	<10	<35	<15	<325
3	<10	<35	<15	<325
4	<10	<35	<15	<325
5	<10	<35	<15	<325
6	<10	<35	<15	<325
7	<10	<35	<15	<325
8	<10	<35	<15	<325
9	<10	<35	<15	<325
10	<10	<35	<15	<325
11	<10	<35	<15	<325
12	<10	<35	<15	<325
13	<10	<35	<15	<325
14	<10	<35	<15	<325
15	<10	<35	<15	<325
16	<10	<35	<15	<325
17	<10	<35	<15	<325
18	<10	<35	<15	<325
19	<10	<35	<15	<325
20	<10	<35	<15	<325
PROMEDIO	N/A	N/A	N/A	N/A
DS	N/A	N/A	N/A	N/A
CV (%)	N/A	N/A	N/A	N/A

Para determinar la especificidad en resultados negativos, se tomaron 20 muestras diferentes de sangre para cada droga que se encontraban libres de las drogas a determinar. Los resultados arrojados por el software se encuentran en el límite inferior de la escala de medición que el método puede analizar, localizados por debajo del punto de corte, obteniendo valores de cero, los cuales son representados con el símbolo “< menor que”. Estos valores representan que no se detectó el analito, por lo que se puede inferir que la matriz (sangre) no contiene sustancias que puedan interferir en las lecturas del equipo, de esta manera se asegura que los resultados registrados como negativos son confiables.

Englobando los resultados positivos y negativos de especificidad, se relacionan con la selectividad del método ya que al presentarse coeficientes de variación menores al 20% para cada droga evalúa la capacidad del equipo para analizar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente pueden incluir impurezas, degradantes en la matriz, etc.

LÍMITE DE DETECCIÓN.

Tabla 18. Límite de detección establecido por el equipo para cada droga.

	Punto de corte (ng/mL)
THC	10
Cocaína	35
Benzodiazepinas	15
Anfetaminas	325

Tabla 19. Nivel 1 probado, superior al límite de detección establecido por el equipo para cada droga.

	NIVEL ALTO PROBADO			
	THC 35 ng/ml	Cocaína 100 ng/ml	Benzodiazepinas 50 ng/ml	Anfetamina 460 ng/ml
1	37	92	53	470
2	36	93	64	471
3	37	81	57	499

4	37	92	59	464
5	38	82	55	448
6	35	74	59	460
7	35	96	56	464
8	35	101	55	452
9	36	87	58	457
10	36	90	66	459
11	37	72	54	466
12	36	89	52	471
PROMEDIO	36.2500	87.4167	57.3333	465.0833
DS	0.9653	8.6808	4.2283	12.9296
CV (%)	2.6629	9.9304	7.3750	2.7801

Tabla 20. Nivel 2 probado, inferior al límite de detección establecido por el equipo, para cada droga.

	NIVEL BAJO PROBADO			
	THC 10 ng/ml	Cocaína 30 ng/ml	Benzodiazepinas 10 ng/ml	Anfetamina 350 ng/ml
1	9	38	3	353
2	8	35	3	348
3	10	45	5	340
4	9	25	4	356
5	11	23	10	360
6	9	29	11	346
7	10	28	3	350
8	8	37	3	355
9	11	38	4	354
10	11	33	9	355
11	12	44	4	346
12	10	38	5	360
PROMEDIO	9.8333	34.4167	4.9167	351.9167
DS	1.2673	7.0124	3.3428	6.0522
CV (%)	12.8878	20.3751	67.9889	1.7198

Para la valoración del parámetro de límite de detección se consideró que el software del equipo establece un límite de detección independiente para cada una de las drogas, se tomó en cuenta este valor y valores inferiores al punto de corte para cada droga, con la finalidad de corroborar que se mantuviera este valor como

el límite de detección confiable, así mismo se tomaron dos niveles de valores, identificados como nivel 1 y nivel 2 por debajo del punto de corte para cada droga mostrado en las tablas 19 y 20.

En cuanto a Anfetaminas, se encontraron errores de medición, en los que el equipo no identificaba la presencia del analito en valores de muestras fortificadas con una concentración por debajo de los 325 ng/mL (umbral establecido por el EMIT). De acuerdo al análisis de resultados para los valores representativos de la concentración nivel bajo (350 ng/mL) se obtuvo un intervalo de 340 a 360 ng/mL y un CV de 1.71%.

Para el nivel 1 se fortificó la muestra con una solución patrón para obtener una concentración de 460 ng/mL. Los resultados obtenidos se encuentran cerca del valor de la concentración conocida, (448 a 471 ng/mL) y un CV de 2.78%, para ambos casos el CV no superó al 20% del margen de error establecido por el equipo, por lo que los valores obtenidos son fiables para estas concentraciones en los dos niveles.

Para benzodiazepinas a pesar de que el umbral marcado por el software es de 15 ng/mL. Para el nivel 2 se fortificó una muestra con una solución patrón para obtener una concentración de 10 ng/mL, siendo capaz de obtener lecturas, con un promedio de 4.91 ng/mL. Con un intervalo de resultados de 3 a 11 ng/mL, que hace referencia que a esta concentración no demuestra buena precisión, y con un CV del 67.3%, que indica que a esta concentración sigue siendo detectada por el software, sin embargo, no cumple con el criterio de aceptación puesto que supera el 20% del margen de error establecido por el equipo, de esta forma se infiere que para valores inferiores de 15 ng/mL no se obtienen lecturas confiables y se determina que el límite de detección dado por el equipo es confiable.

Para el nivel 1 de benzodiazepinas de concentración 50 ng/mL y de acuerdo con los resultados obtenidos se identifican valores que van de 52 a 66, por lo que los valores obtenidos se encuentran cerca de la concentración esperada. Se obtuvo un CV del 7.37%, que al ser menor al margen de error del 20% establecido por el

equipo demuestra que estos valores son fiables para la detección de la droga a esta concentración.

Respecto a la cocaína a pesar de que el límite inferior marcado por el software es de 35 ng/mL, se analizó a una concentración de 30 ng/mL, para el nivel 2, siendo capaz de obtener lecturas que van de 23 a 44 ng/mL, obteniendo en este caso un CV del 20.37%, el cual supera mínimamente el margen de error establecido por el equipo que es del 20%, de esta forma se puede inferir que para valores inferiores de 35 ng/mL se obtienen lecturas poco confiables, por lo que no se cumple con el criterio de aceptación a 30 ng/ml.

Para el Nivel 1 se trató con una concentración 100 ng/mL. En los resultados obtenidos se identificaron valores de 81 a 101 ng/mL, los cuales están cerca de la concentración esperada. Se obtuvo un CV del 9.93%, que al ser menor al margen de error establecido por el equipo demuestra que estos valores son fiables para la detección de la droga a /esta concentración.

En cuanto al THC, el equipo cuenta con un límite inferior marcado por el software es de 10 ng/mL, se analizó una concentración de 10 ng/mL, para el nivel 2, siendo capaz de obtener lecturas, con un promedio de 9.8 ng/mL, observando para este caso un CV del 12.88%, el cual es menor al margen de error establecido por el equipo que es del 20%, de esta forma se puede inferir que para valores sobre los 10 ng/mL se obtienen lecturas confiables.

Para el Nivel 1 se trató un valor de 35 mg/mL. En los resultados obtenidos se tienen valores de 35 a 37 ng/mL, los cuales encuentran cerca de la concentración esperada. Se obtuvo un CV de 2.66%, que al ser menor al margen de error del 20% establecido por el equipo demuestra que estos valores son fiables para la detección de la droga a esta concentración.

Tabla 21. Resumen de coeficientes de variación respecto a cada droga.

DROGA	Valor bajo probado ng/mL	CV (%)	Valor alto probado ng/mL	CV (%)
THC	10	12.88	35	2.66
Cocaína	30	20.37	100	9.93

Benzodicepinas	10	67.98	50	1.37
Anfetaminas	350	1.71	460	2.78

PRECISIÓN Y REPETIBILIDAD

REPETIBILIDAD

Tabla 22. Repetibilidad del método -25%.

	REPETIBILIDAD -25%			
	THC 37.5 ng/mL	Cocaína 112.5 ng/mL	Benzodicepinas 150 ng/mL	Anfetaminas 375 ng/mL
1	37	119	150	365
2	37	115	141	360
3	37	116	150	379
4	37	108	142	371
5	38	110	145	385
6	37	112	137	397
7	37	115	143	380
8	38	115	145	385
9	37	112	148	381
10	38	118	148	380
PROMEDIO	37.30	114.00	144.90	378.30
DS	0.4830	3.4641	4.2282	10.6359
CV (%)	1.2950	3.0387	2.9180	2.8115

De acuerdo con el análisis realizado en el parámetro repetibilidad -25% del punto de corte, se obtuvo que las mediciones para THC fueron las más precisas de las cuatro drogas evaluadas, al presentar una desviación estándar de 0.48, consecuentemente se obtuvo un CV del 1.29% que siendo menor al 20% a lo establecido en la guía de validación de métodos analíticos se cumplen con los criterios de aceptación; por lo tanto, para THC se obtuvo una repetibilidad satisfactoria. Por otra parte, en la evaluación de anfetaminas se encontró una variación de los datos obtenidos con una desviación estándar de 10.63 y un CV de 2.81, que representa que si cumple con los criterios de aceptación. En cuanto a benzodicepinas y cocaína presentaron una desviación estándar de 4.22 y 3.46 respectivamente, lo cual refiere a una precisión satisfactoria y de acuerdo con su CV de 2.91 y 3.03 es aceptable pues se encuentra dentro del 20% establecido en la guía antes mencionada.

Tabla 23. Repetibilidad del método +25%.

REPETIBILIDAD +25%				
Numero de muestra	THC 62.5 ng/mL	Cocaína 187.5 ng/mL	Benzodiazepinas 250 ng/mL	Anfetaminas 625 ng/mL
1	63	196	253	637
2	63	188	258	588
3	64	176	246	578
4	63	199	246	595
5	63	186	251	591
6	63	185	243	589
7	63	182	245	578
8	64	187	253	590
9	63	190	254	606
10	63	186	246	558
PROMEDIO	63.20	187.50	249.50	591.00
DS	0.4216	6.5362	4.9272	20.5426
CV (%)	0.6671	3.4860	1.9748	3.4759

De acuerdo al análisis realizado en el parámetro repetibilidad +25% respecto al punto de corte se obtuvo que las mediciones para THC fueron las más precisas de las cuatro drogas evaluadas, al presentar una desviación estándar de 0.42, consecuentemente se obtuvo un CV del 0.66% que siendo menor al 20% a lo establecido en la guía de validación de métodos analíticos se cumplen con los criterios de aceptación, por lo tanto para THC se obtuvo una repetibilidad satisfactoria, por otro lado, para la evaluación de anfetaminas se encontró un rango amplio de 588 a 637 ng/mL, siendo poco preciso, sin embargo, el CV calculado para estos datos es de 3.47%, mismo que se encuentra dentro de los criterios de aceptación. En cuanto a benzodiazepinas y cocaína presentaron rangos de concentraciones de 243 a 256 ng/mL y 176 a 196 ng/mL respectivamente, lo cual refiere a una precisión satisfactoria, en cuanto a su CV de 1.97% y 3.48% respectivamente; son aceptables ya que no superan al 20% establecido en la guía.

REPRODUCIBILIDAD

Tabla 24. Reproducibilidad del método -25% en dos días diferentes.

Número de muestra*	REPRODUCIBILIDAD -25%			
	THC 37.5 ng/mL	Cocaína 112.5 ng/mL	Benzodicepinas 150 ng/mL	Anfetaminas 375 ng/mL
1	37	119	150	365
2	37	115	141	360
63	37	116	150	379
4	37	108	142	371
5	38	110	145	385
6	37	112	137	397
7	37	115	143	380
8	38	115	145	385
9	37	112	148	381
10	38	118	148	380
11	37	120	150	376
12	37	124	141	368
13	36	125	149	365
14	38	126	144	356
15	37	120	142	372
16	38	121	143	361
17	36	127	141	351
18	39	127	143	356
19	38	124	146	357
20	38	124	145	366
PROMEDIO	37.35	118.90	144.65	370.55
DS	0.7452	5.8571	3.6314	12.1156
CV (%)	1.9951	4.9260	2.5105	3.2696

* Los valores de las muestras del 1 al 10, son los resultados obtenidos en el primer día de análisis y los del 11 al 20 los del segundo día.

En el análisis de este parámetro se tomó el valor de los resultados de dos días diferentes para cada droga, teniendo un total de 20 valores por droga. De los cuales, entre las mediciones de los dos días se presenta una mayor precisión para THC al presentar un intervalo de resultados de 36 a 39 y con un CV de 1.99%; siendo menor al 20%, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido. Por otro lado, para anfetaminas hay una menor precisión ya que presenta un margen más amplio en sus resultados que va de 360 a 397. De acuerdo con su CV de 10.53%,

el cual es menor del 20% cumple con el criterio establecido en la guía de validación de métodos analíticos. En cuanto a benzodiacepinas presenta un rango pequeño de valores de 137 a 150, siendo su CV de 2.51% y para cocaína los resultados obtenidos van de 108 a 127 y con un CV de 4.92%, para estos últimos CV's son aceptables de acuerdo al criterio de aceptación por ser menores al 20%.

Tabla 25. Reproducibilidad del método +25% en dos días diferentes.

REPRODUCIBILIDAD +25%				
Numero de muestra*	THC 62.5 ng/mL	Cocaína 187.5 ng/mL	Benzodiacepinas 250 ng/mL	Anfetaminas 625 ng/mL
1	63	196	253	637
2	63	188	258	588
3	64	176	246	578
4	63	199	246	595
5	63	186	251	591
6	63	185	243	589
7	63	182	245	578
8	64	187	253	590
9	63	190	254	606
10	63	186	246	558
11	66	178	240	741
12	63	191	254	762
13	65	190	242	710
14	63	188	246	713
15	64	192	247	693
16	65	196	244	712
17	68	199	259	690
18	63	192	242	754
19	65	195	247	708
20	63	194	243	698
PROMEDIO	63.85	189.50	247.95	654.55
DS	1.3485	6.3121	5.5296	68.9641
CV (%)	2.1120	3.3309	2.2301	10.5361

* Los valores de las muestras del 1 al 10, son los resultados obtenidos en el primer día de análisis y los del 11 al 20 los del segundo día.

En el análisis de este parámetro se tomó el valor de los resultados de dos días diferentes para cada droga, teniendo un total de 20 valores por droga. De estos resultados se presenta una mayor precisión para THC al tener un intervalo de 63 a 68, con un CV de 2.11%. En cocaína se presenta un intervalo de 176 a 199, con un CV de 3.33%, para benzodiazepinas hay un intervalo de 242 a 259 y un CV de 2.23%. Respecto a estos CV's son menores al margen de error establecido en la guía que es del 20%. Por otro lado, para anfetaminas hay una menor precisión presentando un margen de 558 a 762, sin embargo, de acuerdo a su CV de 10.53% siendo menor al 20% cumple con los criterios establecidos en la guía de validación de métodos analíticos.

ESTABILIDAD

En el análisis de este parámetro se mide la concentración de cada droga en diferentes días, con la finalidad de evaluar la estabilidad de la muestra con el paso del tiempo.

Tabla 26. Estabilidad de la muestra fortificada con THC -25% durante 7 días de almacenamiento.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA -25% THC 37.5 ng/mL							
	Día 1 ng/mL	Día 2 ng/mL	Día 3 ng/mL	Día 7 ng/mL	PROMEDIO	DS	CV (%)
1	37	37	40	37	37.75	1.50	3.97
2	37	37	37	38	37.25	0.50	1.34
3	37	36	36	37	36.5	0.58	1.58
4	37	38	35	39	37.25	1.71	4.58
5	38	37	37	38	37.5	0.58	1.54
6	37	38	37	37	37.25	0.50	1.34
7	37	36	36	36	36.25	0.50	1.38
8	38	39	36	38	37.75	1.26	3.33
9	37	38	38	38	37.75	0.50	1.32
10	38	38	36	37	37.25	0.96	2.57
PROMEDIO	37.30	37.40	36.80	37.50			2.30

Englobando el CV de cada una de las muestras en los cuatro tiempos de análisis, se obtiene un CV promedio de 2.30%, lo que demuestra que para esta concentración del -25% la muestra se mantiene con una variación no significativa, observando que no se presentan metabolitos o componentes que puedan alterar el

resultado del análisis, por lo que la muestra sería estable durante 7 días en refrigeración a 4°C.

Tabla 27. Estabilidad de la muestra fortificada con Benzodiazepinas -25% durante 7 días de almacenamiento.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA -25% Benzodiazepinas 150 ng/mL							
	Día 1 ng/mL	Día 2 ng/mL	Día 3 ng/mL	Día 7 ng/mL	PROMEDIO	DS	CV (%)
1	150	150	151	159	152.5	4.36	2.86
2	141	141	144	143	142.25	1.50	1.05
3	150	149	142	144	146.25	3.86	2.64
4	142	144	146	145	144.25	1.71	1.18
5	145	142	141	147	143.75	2.75	1.92
6	137	143	145	148	143.25	4.65	3.24
7	143	141	148	145	144.25	2.99	2.07
8	145	143	147	147	145.5	1.91	1.32
9	148	146	144	145	145.75	1.71	1.17
10	148	145	146	144	145.75	1.71	1.17
PROMEDIO	144.90	144.40	145.40	146.70			1.86

Al determinar el CV promedio de todas las muestras fortificadas por los días de análisis se obtiene un valor de 2.30%, lo que demuestra que para esta concentración de benzodiazepinas del -25% la muestra se mantiene con una variación no significativa, observando que no se presentan metabolitos o componentes que puedan alterar la estabilidad de la muestra durante 7 días mantenidas en refrigeración.

Tabla 28. Estabilidad de la muestra fortificada con Cocaína -25% durante 3 días de almacenamiento.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA -25% Cocaína 112.5 ng/mL						
	Día 1 ng/mL	Día 2 ng/mL	Día 3 ng/mL	PROMEDIO	DS	CV (%)
1	119	120	127	122.0	4.36	3.12
2	115	124	135	124.67	10.02	8.03
3	116	125	136	125.67	10.02	7.97
4	108	126	135	123.00	13.75	11.18

5	110	120	137	122.33	13.65	11.16
6	112	121	127	120.00	7.55	6.29
7	115	127	135	125.67	10.07	8.01
8	115	127	137	126.33	11.02	8.72
9	112	124	138	124.67	13.01	10.44
10	118	124	135	125.67	8.62	6.86
PROMEDIO	114.00	123.80	134.20			8.18

En los resultados del análisis de esta droga solo se muestran los obtenidos en 3 días consecutivos ya que en la evaluación del día 7 los valores del análisis se lograron CV's mayores al 20%, lo cual no cumple con el criterio de aceptación, por lo que hasta el día 7 la muestra no es estable. Por otra parte, el CV promedio de todas las muestras por los 3 días de análisis se obtiene un valor de 8.18%, el cual es menor al 20% de error dado por el equipo, lo que demuestra que para esta concentración de cocaína del -25% la muestra mantiene una estabilidad de solo 3 días en refrigeración.

Tabla 29. Estabilidad de la muestra fortificada con Anfetaminas -25% durante 7 días de almacenamiento.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA -25% Anfetaminas 375 ng/mL							
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 7	PROMEDIO	DS	CV (%)
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL			
1	365	376	365	400	376.5	16.50	4.38
2	360	368	378	379	371.25	9.00	2.42
3	379	365	375	386	376.25	8.77	2.33
4	371	356	380	383	372.5	12.12	3.25
5	385	372	357	380	373.5	12.23	3.28
6	397	361	364	382	376	16.79	4.47
7	380	351	357	380	367	15.21	4.14
8	385	356	354	382	369.25	16.52	4.47
9	381	357	351	403	373	23.83	6.39
10	380	366	356	381	370.75	11.98	3.23
PROMEDIO	378.30	362.80	363.70	385.60			3.84

Al evaluar el CV promedio de anfetaminas, se obtiene un valor de 3.84%, el cual no supera el margen de error establecido por el equipo, infiriendo que hasta el

día 7 se mantiene la muestra viable para el análisis sin presentar cambios químicos o desintegración física que puedan alterar los resultados.

Tabla 30. Estabilidad de la muestra fortificada con THC +25% durante 7 días de almacenamiento.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA +25% THC 62.5 ng/mL							
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 7	PROMEDIO	DS	CV (%)
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL			
1	63	66	64	65	64.5	1.29	2.00
2	63	63	65	61	63	1.63	2.59
3	64	65	64	65	64.5	0.58	0.90
4	63	63	66	66	64.5	1.73	2.69
5	63	64	65	65	64.25	0.96	1.49
6	63	65	65	65	64.5	1.00	1.55
7	63	68	65	65	65.25	2.06	3.16
8	64	63	64	65	64	0.82	1.28
9	63	65	63	65	64	1.15	1.80
10	63	63	65	66	64.25	1.50	2.33
PROMEDIO	63.20	64.50	64.60	64.80			1.98

En la evaluación de la estabilidad de la muestra para THC, se obtiene un CV promedio de 1.98%, demostrando que las muestras durante el periodo de almacenamiento de 7 días en refrigeración no se producen en la matriz componentes o metabolitos que puedan dar una señal errónea afectando a los resultados.

Tabla 31. Estabilidad de la muestra fortificada con Benzodiazepinas +25% durante 7 días de almacenamiento.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA +25% Benzodiazepinas 250 ng/mL							
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 7	PROMEDIO	DS	CV (%)
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL			
1	253	240	234	260	246.75	11.87	4.81
2	258	254	238	254	251	8.87	3.53
3	246	242	235	244	241.75	4.79	1.98
4	246	246	251	244	246.75	2.99	1.21
5	251	247	241	243	245.5	4.43	1.81
6	243	244	246	244	244.25	1.26	0.52
7	245	259	247	242	248.25	7.46	3.00

8	253	242	247	244	246.5	4.80	1.95
9	254	247	253	260	253.5	5.32	2.10
10	246	243	247	261	249.25	8.02	3.22
PROMEDIO	249.5	246.4	243.9	249.6			2.41

Para benzodiacepinas el estudio duro los 7 días establecidos, obteniendo un CV de 2.41%, el cual es menor al margen de error establecido por el equipo, de esta manera se cumple con el criterio de aceptación, de tal modo la muestra se mantiene estable durante el periodo de estudio.

Tabla 32. Estabilidad de la muestra fortificada con Cocaína +25% durante 3 días de almacenamiento.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA +25% Cocaína 187.5 ng/mL						
	Día 1	Día 2	Día 3	PROMEDIO	DS	CV (%)
	ng/mL	ng/mL	ng/mL			
1	196	178	203	192.33	12.90	6.71
2	188	191	201	193.33	6.81	3.52
3	176	190	205	190.33	14.50	7.62
4	199	188	197	194.67	5.86	3.01
5	186	192	193	190.33	3.79	1.99
6	185	196	204	195.00	9.54	4.89
7	182	199	204	195.00	11.53	5.91
8	187	192	209	196.00	11.53	5.88
9	190	195	197	194.00	3.61	1.86
10	186	194	204	194.67	9.02	4.63
PROMEDIO	187.50	191.50	201.70			4.60

En el caso de cocaína la estabilidad que tiene la muestra solo se cumplió en los primeros 3 días, debido que a partir de este día pudieron producirse sustancias secundarias o metabolitos que afectan los resultados elevándolos, debido a esto, el CV de 28.91% siendo mayor al 20% establecido. De acuerdo a este resultado se contempla una buena estabilidad de la matriz hasta el tercer día ya que tiene un 4.60% de error respecto a todas las mediciones.

Tabla 33. Estabilidad de la muestra fortificada con Anfetaminas +25% durante 2 días de almacenamiento.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA +25% Anfetaminas 625	
ng/mL	

	Día 1 ng/mL	Día 2 ng/mL	PROMEDIO	DS	CV (%)
1	637	741	689	73.54	10.67
2	588	762	675	123.04	18.23
3	578	710	644	93.34	14.49
4	595	713	654	83.44	12.76
5	591	693	642	72.12	11.23
6	589	712	650.5	86.97	13.37
7	578	690	634	79.20	12.49
8	590	754	672	115.97	17.26
9	606	708	657	72.12	10.98
10	558	698	628	98.99	15.76
PROMEDIO	591.00	718.10			13.72

Debido a la concentración (625 ng/mL) de anfetaminas se generaron posiblemente sustancias de degradación que afectaron el análisis del tercer día, obteniendo un CV del 29.3%, con este valor descartamos la evaluación de la estabilidad hasta este día ya que supera el 20% establecido, por lo que en la valoración de los primeros dos días se obtuvo un CV de 13.72%, dicho valor nos indica que la muestra mantiene su estabilidad.

Resultados en casos reales

Estos resultados se corroboraron con la lectura de los controles, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 34. Resultados de controles en el día de análisis de los casos reales.

	Rango (ng/mL)	Valor obtenido (ng/mL)
Benzodicepinas	160 - 240	233
THC	40 - 60	53
Cocaína	120 - 180	161
Anfetaminas	400 - 600	539

Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango establecido para cada droga.

Tabla 35. Dosis letales para cada droga evaluada.

	DOSIS LETAL
THC	Desconocida
COCAÍNA	20mg
BENZODIACEPINAS	Triazolam 5 mg, Flunitrazepam 20 mg, Nitrazepam 50 mg, Loracepam 100 mg, Diazepam 500 mg, Cloracepato 500 mg.
ANFETAMINAS	Consumo mayor a 500 mg

Tabla 36. Resultados de casos reales (negativas)

MUESTRAS NEGATIVAS	
CAUSA DE MUERTE	OBSERVACIONES
Recién nacido, broncoaspiración.	Ausencia de drogas.
Disparo en tórax, asalto a mano armada.	Ausencia de drogas.
Hecho de tránsito.	Ausencia de drogas.
Asalto con arma punzocortante.	Ausencia de drogas.

Tabla 37. Resultados de casos reales (positivos a los analitos evaluados)

MUESTRAS POSITIVAS.		
CAUSA DE MUERTE	CONCENTRACIÓN DE DROGA ENCONTRADA.	OBSERVACIONES
Caída en las escaleras, traumatismo craneoencefálico.	1000 ng/mL de benzodiazepinas.	Derivado a la caída en hospitalización se administraron benzodiazepinas con el objetivo de evitar convulsiones y producir un efecto sedante.

Disparo por arma de fuego	75 ng/mL de THC, 402 ng/mL de benzodiazepinas y 640 ng/mL de anfetaminas	A causa de riña.
Suicidio, por ahorcamiento	64 ng/mL de THC	Problemas psicológicos por lo que los efectos del THC afectan en su estado de ánimo. Derivado al accidente, en hospitalización se administraron benzodiazepinas con el objetivo de evitar convulsiones y producir un efecto sedante
Hecho de tránsito, traumatismo craneoencefálico con laceraciones múltiples	918 ng/mL de benzodiazepinas	Tras el consumo de esta droga, el usuario puede presentar valor y euforia . Debido a los efectos psicoactivos que presenta el THC, se altera la capacidad visual espacial
Enfrentamiento armado	1319 ng/mL de anfetaminas	
Atropellado	60 ng/mL de THC	

4. CONCLUSIONES

Una vez realizada la validación del método de inmunoensayo EMIT se dan a conocer las siguientes conclusiones

- Se determinaron condiciones a las cuales debe ser tratada la matriz, estas condiciones deben cumplirse para que al momento del análisis se puedan obtener resultados fiables y certeros.
- Una vez que se evaluó la matriz (plasma) de 20 diferentes muestras de sangre, se observó que la composición de dicha matriz no genera señal alguna que permita dentro del principio del método obtener una respuesta que afecte de forma directa el cálculo de la concentración de cada uno de los parámetros evaluados, de esta forma no se obtuvo para ninguno de los casos anteriores un falso positivo, por el efecto de la matriz.
- A partir del análisis de resultados del parámetro de especificidad se comprueba que en la matriz no se encuentran sustancias que puedan interferir en las lecturas del equipo, cumpliendo con los criterios establecidos por la UNODC, 2014 para el parámetro de especificidad al analizar muestras sanguíneas.
- Los resultados obtenidos sugieren que el límite de detección propuesto por el software del equipo es un umbral confiable para la determinación de valores cercanos a este, por otra parte, se observó que las lecturas debajo de este valor predeterminado pueden no ser confiables.
- Se demuestra que para THC, Benzodiazepinas y Cocaína los resultados obtenidos son repetibles en las concentraciones $\pm 25\%$ debido a que no presentan variación significativa y su margen de error es menor a 20%, por otra parte, Anfetaminas presenta una mayor variación en los resultados de concentración $+25\%$ que en la del -25% , lo cual sugiere que, para esta droga, las sustancias generadas al paso de los días en la matriz pueden interferir en la lectura del parámetro.
- En la determinación de estabilidad de la muestra se obtiene que THC, Benzodiazepinas y Anfetaminas para la concentración de -25% se preservan de manera idónea hasta el día 7 de análisis, sin que se encuentren resultados

de sus CV que superen del 20% sin embargo para Cocaína solo cumple con estabilidad de la matriz hasta el día 3. En la concentración del +25%, para THC y Benzodiazepinas la muestra se conserva cumpliendo hasta el día 7 de análisis, obteniendo resultados sin variaciones significativas, por otra parte, para Cocaína a partir del día 4 y para Anfetaminas a partir del día 3 los valores obtenidos presentaron variaciones significativas que superaban el 20% del margen de error establecido por la UNODC,2014.

- Se elaboró un PNO donde se describe la metodología para el análisis de la nueva matriz.
- Se obtuvieron 10 casos, los cuales se analizaron y en algunos se obtuvieron resultados positivos a drogas de abuso, estos resultados positivos fueron relacionados con su causa de muerte, determinando así, que posiblemente los efectos en los que se encontraban los individuos fueron causantes del deceso.

REFERENCIAS

- Abanades, S., Cabrero, A., Fiz, J., & Farré, M. (2005). *Farmacología clínica del cannabis*. *Dolor*, 20, 189–192. [Fecha de consulta 09 de julio del 2019]. Disponible en: <http://public-files.prbb.org/publicacions/9511f434-4494-4e68-9ad8-b56c3b6aba88.pdf>
- Anderson, R., Bramley, R., & Clarke, D. (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Nueva York. 11-55. [Fecha de consulta 05 de septiembre del 2019]. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Book_S.pdf
- Auriostigue, J. C. (2014). *Desarrollo y validación de un inmunoensayo enzimático para la cuantificación de productos finales de glicación avanzada*. Universidad Nacional Autónoma de México. [Fecha de consulta 09 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2014/mayo/0713870/Index.html>
- Bogusz, M., Aderjan, R., & Schmitt, G. (1990). *The determination of drugs of abuse in whole blood by means of FPIA and EMIT-dau Immunoassays a comparative study*. *Forensic Science International*, 48(1), 27–32. [Fecha de consulta 13 de octubre del 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0379073890902695>
- Bortolotti, F., Gottardo, R., Pascali, J., & Tagliaro, F. (2012). *Toxicokinetics of Cocaine and Metabolites: The Forensic Toxicological Approach*. *Current Medicinal Chemistry*, 19(33), 5659–5661. [Fecha de consulta 14 de julio del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22856660>
- Bousofara, M., & Raucoules, M. (2016). *Farmacología de las benzodiazepinas utilizadas en anestesia-reanimación*. *EMC Anestesia-Reanimación*, 42(4), 4–9. [Fecha de consulta 27 de julio del 2019]. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S1280-4703\(16\)80722-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1280-4703(16)80722-7)
- Carpentier, C., Me, A., & Gibbons, J. (2018). *Reporte Global de uso de Drogas 2018*. UNODC United Nations Office on Drugs and Crime. [Fecha de consulta 05 de julio del 2019]. Disponible en: https://www.unodc.org/wdr2018/prelaunch/WDR18_Booklet_2_GLOBAL.pdf
- Cavanagh, K., Thomas, D., & Roger, T. (1978). *Assessment of the EMIT technique as a screening test for opiates and methadone for a methadone maintenance clinic and its calibration by bayesian statistics*. *Clinic Biochem*, 11(5), 210–213. [Fecha de consulta 29 de septiembre del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/365392>
- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. (2016). *Guía de validación de métodos analíticos*. Ciudad de México. [Fecha de consulta 03 de septiembre del 2019]. Disponible en: https://www.academia.edu/4513278/Guia_de_Validacion_de_metodos_analiticos_editada_por_QFB_de_Mexico
- Crespo, J., & Rodríguez, C. (2007). *Bases neuroanatómicas, neurobiológicas y del aprendizaje de la conducta de adicción a la cocaína*. *Latinoamericana de Psicología*, 39(1), 85–87. [Fecha de consulta 14 de julio del 2019]. Disponible en: http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-05342007000100008
- Cruz, L. (2005). *Detección del principal metabolito de cocaína (Benzoilecgonina, BE) en orina mediante la técnica de Inmunoensayo Enzimático Múltiple (EMIT) y cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/MS)*. Universidad

- Nacional Autónoma de México. [Fecha de consulta 14 de agosto del 2019]. Disponible en: <http://132.248.9.195/pdtestdf/0340330/Index.html>.
- Engvall, E., & Jonsson, K. (1980). Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. *Methods in Enzymology*, 70(1972), 428–431. [Fecha de consulta 17 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687980700678>
- Ermer, J., & John, M. (2005). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. WILEY-VCH. 12-14. [Fecha de consulta 18 de septiembre del 2019]. Disponible en: <http://www.pharmaresearchlibrary.com/wp-content/uploads/2013/03/Method-Validation-in-Pharmaceutical-Analysis.pdf>
- Escobar, I., Berrouet, M., & González, D. (2009). Mecanismos moleculares de la adicción a la marihuana. *Psiquiat*, 38(1), 127–129. [Fecha de consulta 09 de julio del 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0034-74502009000100010&script=sci_abstract&tlng=es
- Espinosa, N., González, R., & Vidal del Río, M. (2017). Aproximación a elementos contemporáneos del consumo de drogas legales en adolescentes. *Medicinas UTA*, 1(3), 26–31. [Fecha de consulta: 26 de junio del 2019] Disponible en: <https://medicinasuta.uta.edu.ec/index.php/MedicinasUTA/article/view/17+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx>
- Esther, G., López, Á., Brindis, F., Niizawa, S. C., & Martínez, R. V. (2014). Cannabis sativa L., una planta singular. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(4), 2–5. [Fecha de consulta 08 de julio del 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000400004
- Fernandez, A., Gonzalez, A., & Peña, M. (2003). Bases científicas para el uso de las benzodiazepinas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 19(1), 7–9. [Fecha de consulta 24 de julio del 2019]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252003000100014&lng=es&tlng=es.
- Fernandez, P. L., & Lizasoain, I. (2003). Características farmacológicas de las drogas recreativas (MDMA y otras anfetaminas, Ketamina, GHB, LSD y otros alucinógenos). *Adicciones*, 15(2), 52–55. [Fecha de consulta 07 de agosto del 2019]. Disponible en: <http://www.adicciones.es/index.php/adicciones/article/view/453>
- Flores, D. (2010). Identificación de cocaína y THC en cabello empleando la técnica de EMIT CG/MS. Universidad Nacional Autónoma de México. [Fecha de consulta 25 de agosto del 2019]. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2010/abril/0656148/Index.html>.
- Giannuzzi, L., & Ferrari, A. (2006). *Manual de técnicas analíticas en el laboratorio de toxicología y química forense*. Buenos Aires. [Fecha de consulta 23 de agosto del 2019]. Disponible en: http://cqfp.pe/wp-content/uploads/pdf/toxicologia_may_2019/Manual_Toxicologia_editado_oct_2006_Luis_Ferrari.pdf
- Gjerde, H., Christophersen, A. S., Skuterud, B., Klemetsen, K., & Mørland, J. (1990). Screening for drugs in forensic blood samples using EMIT® urine assays. *Forensic Science International*, 44(2), 179–184. [Fecha de consulta 12 de octubre del 2019]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(90\)90248-W](https://doi.org/10.1016/0379-0738(90)90248-W)
- González, I., Tumuluru, S., González, M., & Gavira, M. (2015). Cocaína: una revisión de la adicción y el tratamiento. *Asociación Española de Neuropsiquiatría*, 35(127),

- 556–560. [Fecha de consulta 12 de julio del 2019]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0211-57352015000300008
- González, L., Rivas, N., & Farías, L. (2016). Estudio de alcance de terapia ocupacional y drogodependencias: reflexiones críticas de los contextos, prioridades y miradas en la investigación. *Revista Chilena de Terapia Ocupacional*, 16(2), 12–15. [Fecha de consulta 26 de junio del 2019]. Disponible en: <https://revistas.uchile.cl/index.php/RTO/article/view/44747>
- Hastedt, M. (2014). Disposition of toxic drugs and chemicals in man. *Forensic Science*, 11(1), 1. [Fecha de consulta 22 de agosto del 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/271739081_R_C_Baselt_ed_Disposition_of_toxic_drugs_and_chemicals_in_man_10th_edition
- Ishikawa, E. (1999). Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. In 27 (pp. 43–47). Nueva York: ELSEVIER. [Fecha de consulta 15 de agosto del 2019].
- Lecuona, M., Guerrero, A., & Zarco, K. (2005). Notas de sangre y hematopoyesis. 41–44. [Fecha de consulta 28 de septiembre del 2019]. Disponible en: https://www.academia.edu/32781235/NOTAS_DE_HISTOLOGIA_2014
- Lewellen, L., & McCurdy, H. (1988). A novel procedure for the analysis of drugs in whole blood by homogeneous Enzyme Immunoassay (EMIT). *Analytical Toxicology*, 12(3), 260–264. [Fecha de consulta 12 de octubre del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2906382>
- Lizasoain, I., Moro, M., & Lorenzo, P. (2002). Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones*, 13, 59–62. [Fecha de consulta 12 de julio del 2019]. Disponible en: <http://www.adicciones.es/index.php/adicciones/article/view/513>
- López, F. (2013). Determinación postmortem de cocaína y de benzoílecgonina en una muestra de hígado. *Universidad Nacional Autónoma de México*. [Fecha de consulta 17 de julio del 2019]
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Moro, M., Leza, C., & Portolés, A. (2008). *Farmacología básica y clínica* (18a ed.). Madrid: Panamericana. [Fecha de consulta 18 de julio del 2019].
- Loyd, A., & Lou, S. (1981). Specificity of the EMIT drug abuse urine assay methods. *Clinical Toxicology*, 18(9), 1058–1065. [Fecha de consulta 06 de octubre del 2019]. Disponible en: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L12177138%0Ahttp://vb3lk7eb4t.search.serialsolutions.com?sid=EMBASE&issn=00099309&id=doi:&atitle=Specificity+of+the+EMIT+drug+abuse+urine+assay+methods&stitle=CLIN.+TOXICOL.&title=C>
- Madea, B., & Frank, M. (2004). Postmortem toxicology. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 6(4), 71–72. [Fecha de consulta 17 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/journal/forensic-science-international/vol/142/issue/2>
- Malkus, H., Ducesare, J., Meola, J., & Pippenger, C. (1978). Evaluation of Emit Methods for the determination of the five major antiepileptic drugs on an automated kinetic analyser. *Clinic Biochem*, 142(4), 140–142. [Fecha de consulta 25 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/361285>
- Martínez, A. (2016). Criterios cuantitativos en toxicología forense. *Medicina Legal*, 40(1), 31–33. [Fecha de consulta 20 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-medicina-legal-285-articulo-criterios-cuantitativos-toxicologia-forense-S0377473213000114>
- Michael Asselin, W., Leslie, J. M., & McKinley, B. (1988). Direct detection of drugs of abuse in whole hemolyzed blood using the emit d.A.u. urine assays. *Analytical*

- Toxicology*, 12(4), 211–214. [Fecha de consulta 06 de octubre del 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jat/12.4.207>
- Moffat, A. C., Osselton, M. D., & Widdop, B. (Eds.). (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. The Serials Librarian (4a ed.). Pharmaceutical Press. [Fecha de consulta 30 de julio de 2019]. Disponible en: https://doi.org/10.1300/J123v27n02_07
- Netzahualcoyotzi, C., Muñoz, G., Martínez, I., & Florán, B. (2009). La marihuana y el sistema endocanabinoide: De sus efectos recreativos a la terapéutica. *Biomed*, 20(2), 128–134. [Fecha de consulta 09 de julio del 2019]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=23068>
- ONUDC. (2014). *Infórmate acerca de las drogas*. UNODC Oficinas de Las Naciones Unidas Contra Las Drogas y el Delito., 4–5. [Fecha de consulta 30 de junio del 2019]. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/drugs/printmaterials2012/getthefacts2012/getthefacts12_ES_HIRES.pdf
- Organización Mundial de la Salud. (2010). Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos Consideraciones generales. 32-37. [Fecha de consulta 18 de septiembre del 2019]. Disponible en: https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/documents/TRS957_annex_1_SPANISH.pdf
- Pacheco Martínez, N. (2010). Estudio comparativo de inmunoensayo enzimático multiplicado, radioinmunoensayo y quimioluminiscencia como metodos preliminares para detectar drogas de buso. Universidad Nacional Autonoma de México. [Fecha de consulta 03 de septiembre del 2019].
- Palencia, A., & Romero, G. (2008). Las muestras en toxicología forense. Importancia de la cadena de custodia. *Revista de La Facultad de Ciencias de La Salud.*, 12(3), 52–58. [Fecha de consulta 22 de septiembre del 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=3759/375938988011>
- Philip, D., Pietschmann, T., & Niaz, K. (2018). Informe mundial sobre las drogas 2018. UNODC Research, 2–6. [Fecha de consulta 05 de julio del 2019]. Disponible en: http://fileservr.idpc.net/library/WDR18_ExSum_Spanish.pdf
- Piña, R. (2013). Determinación de Flunitrazepam en pelo por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas (CLAR-EM). Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química. [Fecha de consulta 24 de julio del 2019].
- Robertson, M., & Drummer, O. (1998). Stability of nitrobenzodiazepines in post-mortem blood. *J Forensic Sci*, 43(1), 5–8. [Fecha de consulta 22 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1520 / JFS16081J>
- Robledo, P. (2008). Las anfetaminas. *Trastornos Adictivos*, 10(3), 167–171. [Fecha de consulta 07 de agosto del 201]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-trastornos-adictivos-182-articulo-las-anfetaminas-13128591>
- Rojas, E., Real, T., García-Silberman, S., & Medina, M. (2011). Revisión sistemática sobre tratamiento de adicciones en México. *Salud Mental*, 34(4), 353–358. [Fecha de consulta 26 de junio del 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33252011000400008
- Saccone, I., & Ryan, S. (2011). *Consumo de drogas: ¿Qué hacer desde la escuela?* (2da ed.). Buenos Aires. [Fecha de consulta 02 de julio del 2019]. Disponible en: <http://www.bnm.me.gov.ar/giga1/documentos/EL005346.pdf>
- Sánchez, J. C., Villareal, M. E., Ávila, M. E., Vera, A., & Musitu, G. (2014). Contextos de socialización y consumo de drogas ilegales en adolescentes escolarizados.

- Psychosocial Intervention*, 23(1), 71–74. [Fecha de consulta 29 de junio del 2019]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1132-05592014000100008
- SIEMENS. (2015). *EMIT II plus*, Inserto. SIEMENS, 1 [Fecha de consulta 25 de agosto del 2019].
- Soria, M., & Valverde, J. (2015). Interés de las muestras para los estudios químico-toxicológicos post mortem. *Revista Española de Medicina Legal*, 41(2), 73–76. [Fecha de consulta 20 de agosto del 2019]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reml.2015.01.002>
- Tamosiunas, G., Pagano, E., & Artagaveytia, P. (2013). Una introducción al perfil farmacológico y terapéutico de la marihuana. *Arch Med Interna*, 35(3), 113–116. [Fecha de consulta 09 de julio del 2019]. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-423X2013000300010
- Tapia, R., Medina, E., & Sepúlveda, J. (2016). Consumo de drogas: Prevalencias globales, tendencias y variaciones estatales. *Encuesta Nacional de Consumo de Drogas Alcohol y Tabaco*, 1, 1–2. [Fecha de consulta 05 de julio del 2019]. Disponible en: www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/234856/CONSUMO_DE_DROGAS.pdf
- THC and CBD, What Else Interacts With CB1 Cannabinoid Receptors? (2018). [Fecha de consulta 10 de julio del 2019]. Disponible en: <https://marijuanally.com/thc-and-cbd-what-else-interacts-with-cb1-cannabinoid-receptors>
- Urrutia, A. (2013). Efecto de metanfetamina sobre la actividad de metaloproteinasas y sobre la integridad de la barrera hematoencefálica en ratón: estudios de neurotoxicidad. Universidad Complutense de Madrid. [Fecha de consulta 07 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/21198/1/T34442.pdf>
- Utrilla, P. (2000). Aspectos farmacológicos de las anfetaminas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 69–72. [Fecha de consulta 06 de agosto]. Disponible en: <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5734>
- Valenzuela, G. (2013). Propuesta de una metodología para detección de drogas de abuso en muestras de orina, en el laboratorio de análisis clínicos del Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED). Universidad Autónoma del Estado de México. [Fecha de consulta 07 de julio del 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000056770.30922.E6>
- Vogel, J., & Hodnett, C. N. (1981). Detection of drugs in vitreous humor with an enzyme immunoassay technique. *Journal of Analytical Toxicology*, 5(6), 307–309. [Fecha de consulta 24 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jat/5.6.307>
- Volkow, N. (2010). *Cocaína: Abuso y adicción*. National Institute On Drug Abuse, 2–4. [Fecha de consulta 12 de julio del 2019]. Disponible en: <https://d14rmgtrwzf5a.cloudfront.net/sites/default/files/rrcocaina.pdf>
- Volkow, N., Baler, R., Compton, W., & Weiss, S. (2014). Adverse health effects of marijuana use. *The New England Journal of Medicine*, 2219–2221. [Fecha de consulta 08 de julio del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24897085>.

Identificación de drogas de abuso (tetrahidrocannabinol, cocaína benzodicepinas y anfetaminas) en sangre.



FISCALÍA GENERAL DE JUSTICIA DEL ESTADO DE MÉXICO
COORDINACIÓN GENERAL DE SERVICIOS PERICIALES
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA FORENSE

Emisión: ENERO- 2020

Versión: 0001

Clave: EMIT-001-2020

Página 1 de 8

OBJETIVO

Realizar el método de análisis inmunoensayo EMIT en muestras de sangre post mortem para la detección de la presencia de cannabis (THC), benzodicepinas, cocaína y anfetaminas.

ALCANCE

Este procedimiento aplica para el personal operativo del laboratorio de toxicología Forense de la Coordinación General de Servicios Periciales del Estado de México.

RESPONSABILIDADES

- a) De la Jefa del laboratorio de Toxicología Forense revisar, autorizar y firmar todos los PNO.
- b) Del perito que elaboró el PNO, dar a conocer el PNO al personal dedicado a cada proceso.
- c) De los Peritos y auxiliares técnicos del laboratorio de Toxicología Forense el cumplimiento de este procedimiento.
- d) Es responsabilidad de la Jefa del laboratorio de Toxicología Forense supervisar el cumplimiento de este procedimiento y proporcionar los materiales y reactivos necesarios.

GENERALIDADES

La toxicología *post-mortem* tiene como objetivo fundamental determinar si el alcohol etílico, las drogas de abuso, los medicamentos u otros tóxicos pueden haber causado o contribuido a la muerte de una persona. Los ensayos inmunológicos de

Elaboró: J. León Fecha: 04/01/20 Firma: Nombre: P.QFB Joel Eduardo León Hernández Puesto: Pasante	Revisó: P. Gamboa Fecha: 04/01/20 Firma: Nombre: Q. Pedro Antonio Gamboa Chigora. Puesto: Perito en toxicología	Aprobó: A. Chávez Fecha: 04/01/20 Firma: Nombre: Dra. Araceli Amaya Chávez Puesto: Coordinadora licenciatura QFB.	Autorizó: P. García Fecha: 04/01/20 Firma: Nombre: QFB Paulina García Moreno Puesto: Jefa de los Laboratorios de Química y Toxicología Forense
---	---	---	--

Identificación de drogas de abuso (tetrahidrocannabinol, cocaína benzodiazepinas y anfetaminas) en sangre.



FISCALÍA GENERAL DE JUSTICIA DEL ESTADO DE MÉXICO
COORDINACIÓN GENERAL DE SERVICIOS PERICIALES
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA FORENSE

Emisión: ENERO- 2020

Versión: 0001

Clave: EMIT-001-2020

Página 2 de 8

mayor uso en Toxicología son aquellos destinados a la búsqueda de drogas de abuso (opiáceos, cocaína, benzodiazepinas, amfetaminas, entre otros) y algunos fármacos en orina (barbitúricos, dextropropoxifeno, fenciclidina, metadona, ácido lisérgico, antidepresivos tricíclicos) (Giannuzzi y Ferrari, 2006).

Inmunoensayos enzimático y la identificación de drogas en toxicología forense.

La toxicología forense se define como la ciencia del envenenamiento relacionado con el derecho establecido, es decir la aplicación de la toxicología a las situaciones que pueden tener trascendencia médico legal y su objetivo es proporcionar las respuestas a las cuestiones que puedan surgir durante las investigaciones criminales o en los consecuentes procesos judiciales (Madea y Frank, 2004). En toxicología forense se requieren resultados analíticos científicamente indiscutibles y legalmente defendibles.

Los análisis de sangre son los únicos que permiten extrapolar los valores correspondientes desde el momento en que se recogieron las muestras, hasta el momento del accidente o del incidente, pudiéndose así establecer una hipótesis sobre la concentración de la droga en sangre en el momento que nos interesa y deducir, como consecuencia, el posible grado de afectación del individuo en el momento del incidente, (Palencia y Romero, 2008).

Método EMIT (técnica de inmunoensayo enzimático múltiple).

El método EMIT es una de las técnicas de inmunoensayo con mayor aplicación en el análisis de fármacos o drogas de abuso, se trata, por tanto, de un inmunoensayo enzimático competitivo entre la droga en la muestra y la droga marcada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) por los sitios de unión de los anticuerpos. La actividad enzimática disminuye al unirse con el

Identificación de drogas de abuso (tetrahidrocannabinol, cocaína benzodiazepinas y anfetaminas) en sangre.



FISCALÍA GENERAL DE JUSTICIA DEL ESTADO DE MÉXICO
COORDINACIÓN GENERAL DE SERVICIOS PERICIALES
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA FORENSE

Emisión: ENERO- 2020

Versión: 0001

Clave: EMIT-001-2020

Página 3 de 8

anticuerpo, de manera que la concentración de la droga en la muestra puede medirse en función de la actividad enzimática. La enzima activa convierte la nicotinamida adenín dinucleótido (NAD) en NADH, lo cual causa una variación de la absorbancia que se mide por espectrofotometría a 340 nm. La G6PDH endógena en el suero no interfiere porque la coenzima NAD funciona solamente con la enzima bacteriana (*Leuconostoc mesenteroides*) utilizada en el ensayo (SIEMENS, 2015). En este PNO se evalúa principalmente THC, Benzodiazepinas, Cocaína y Anfetaminas.

El **THC** presente en la marihuana, es el de mayor interés forense. Además del efecto psicoactivo de algunos cannabinoides, también se han atribuido efectos farmacológicos, tales como: antinociceptivo, antiepiléptico, cardiovascular, inmunosupresivo, antiemético, estimulante del apetito, antimicrobiano, antiinflamatorio y neuroprotector (Volkow et al., 2014).

La **cocaína** es un estimulante extremadamente adictivo que afecta directamente al cerebro. La cocaína ha sido llamada la droga de los años ochenta y noventa por su gran popularidad y uso extendido en esas décadas (Volkow, 2010). La cocaína o benzoilmetilecgonina es el principal alcaloide obtenido de las hojas del arbusto *Erithroxylon coca*. Las dos formas principales en que se presenta la cocaína son la sal soluble en agua (clorhidrato) que puede aspirarse o inyectarse, y la base insoluble en agua, también conocida como crack, que se consume principalmente fumada. La mayoría de las veces se presenta como un polvo cristalino blanco o blanco apagado (González et al., 2015).

Las **benzodiazepinas**, son medicamentos psicotrópicos que actúan sobre el sistema nervioso central, con efectos sedantes, hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivos, amnésicos y relajantes musculares. Por ello se usan estos

Identificación de drogas de abuso (tetrahidrocannabinol, cocaína benzodicepinas y anfetaminas) en sangre.



FISCALÍA GENERAL DE JUSTICIA DEL ESTADO DE MÉXICO
COORDINACIÓN GENERAL DE SERVICIOS PERICIALES
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA FORENSE

Emisión: ENERO- 2020

Versión: 0001

Clave: EMIT-001-2020

Página 4 de 8

fármacos en medicina para la terapia de la ansiedad, por estos efectos son de importancia forense (Lorenzo et al., 2008).

Las **anfetaminas** en la actualidad, presentan modificaciones de la molécula se dirigen en dos sentidos: en el ámbito terapéutico, con la búsqueda de sustancias en las que predomine el efecto sobre el estimulante del SNC; y en el ámbito ilícito, buscando estructuras en las que la acción estimulante se transforme en alucinógena, consiguiendo cada vez mayor potencia (Robledo, 2008).

METODOLOGÍA

Reactivos

- Kit Reactivo de ensayo Emit® II Plus Benzodiazepines assay.
- Kit Reactivo de ensayo Emit® II Plus THC assay.
- Kit Reactivo de ensayo Emit® II Plus Cocaine assay.
- Kit Reactivo de ensayo Emit® II Plus amphetamines assay.
- HCl 0.1 N.
- Solución de lavado.
- Agua bidestilada.

Calibradores

- Calibrador nivel 0 Emit® II Plus.
- Calibrador nivel 1 Emit® II Plus.
- Calibrador nivel 2 Emit® II Plus.
- Calibrador nivel 3 Emit® II Plus.
- Calibrador nivel 4 Emit® II Plus.
- Calibrador nivel 5 Emit® II Plus.

Muestra

- Muestra biológica sangre (plasma)

Identificación de drogas de abuso (tetrahidrocannabinol, cocaína benzodiazepinas y anfetaminas) en sangre.



FISCALÍA GENERAL DE JUSTICIA DEL ESTADO DE MÉXICO COORDINACIÓN GENERAL DE SERVICIOS PERICIALES DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA FORENSE

Emisión: ENERO 2020

Versión: 0001

Clave: EMIT-001-2020

Página 5 de 8

Material

- Micropipeta de 100 a 1000 μ l
 - Micropipeta de 10 a 100 μ l
 - Puntas para micropipeta
 - Tubos de ensaye de rosca con tapa
 - Gradilla
 - Cubetas de plástico para muestra Emit®
 - Equipo de protección personal
 - Material volumétrico (grado A)
-
- Equipos e instrumentos
 - Equipo Viva-Twin® (Equipo mediante el cual se lleva a cabo el método de inmunoensayo EMIT)
 - Centrifuga

A) Calibración del equipo

- La calibración del equipo se realizó mediante una curva de calibración que se efectúa cada 15 días, de acuerdo a lo establecido por proveedor.
- Se emplearon calibradores nivel 0,1,2,3,4 y 5. Se colocaron 200 μ L de cada calibrador en 6 cubetas de plástico para Emit® por separado. Se continuó con el procedimiento del equipo:
- Solicitud de muestras: se indica como tipo de muestra "CALIBRAR" y se selecciona la opción "qAmphetamines, qBenzodiazepine, qCocaine y qTHC 50".
- Cargar muestras: en automático el programa indica que se deben de colocar las 6 cubetas: nivel 0,1,2,3,4 y 5 Oprimir el botón "ENTER" para que el software asigne la posición y colocar las cubetas.
- Medición: esperar a que el equipo concluya el análisis. De ser calibrado satisfactoriamente se aceptar la calibración.

Identificación de drogas de abuso (tetrahidrocannabinol, cocaína benzodiazepinas y anfetaminas) en sangre.



FISCALÍA GENERAL DE JUSTICIA DEL ESTADO DE MÉXICO
COORDINACIÓN GENERAL DE SERVICIOS PERICIALES
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA FORENSE

Emisión: ENERO 2020

Versión: 0001

Clave: EMIT-001-2020

Página 6 de 8

B) Medición de controles

- Se usaron los calibradores 2 y 3, se dispusieron 200µL de cada calibrador en cubetas de plástico.
- Se realiza el análisis diariamente de los siguientes controles para discriminar variaciones del $\pm 20\%$ de los valores del punto de corte.
- Cargar muestras: oprimir el botón “ENTER” para que el software asigne la posición y colocar las cubetas.

- Iniciar medición: esperar a que el equipo concluya el análisis. Se verifica que ambos controles se encuentren dentro de su rango establecido.

Tabla 1. Valores de controles

Droga	Calibrador/control nivel 2 (ng/mL)	Calibrador/control nivel 3 (ng/mL)	$\pm 20\%$ de los valores del punto de corte. (ng/mL)
Benzodiazepinas	100	200	160-240
THC	20	50	40-60
Cocaína	150	300	120-180
Anfetaminas	500	1000	400-600

- En caso de que los controles se encuentren fuera del intervalo establecido para cada parámetro ($\pm 20\%$ del punto de corte), repetir la misma operación del punto de medición de controles.

Identificación de drogas de abuso (tetrahidrocannabinol, cocaína benzodicepinas y anfetaminas) en sangre.



FISCALÍA GENERAL DE JUSTICIA DEL ESTADO DE MÉXICO
COORDINACIÓN GENERAL DE SERVICIOS PERICIALES
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA FORENSE

Emisión: ENERO 2020

Versión: 0001

Clave: EMIT-001-2020

Página 7 de 8

C) Obtención de la muestra

Al laboratorio se remiten las muestras tomadas por el médico legista, de las cuales se eligen las que cumplan con un correcto llenado de la cadena de custodia, la muestra debe estar bien identificada, con nombre, folio y carpetas de investigación que deben corresponder con los que se encuentran en la cadena de custodia.

D) Obtención plasma.

- Agitar la muestra cuidadosamente para homogenizarla.
- Separar 2 mL de sangre en un tubo de ensaye de rosca.
- Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.

E) Análisis de la muestra.

- Tomar 100 µL del sobrenadante y transferir a una cubeta para su análisis en el equipo Viva-Twin®.
- En el panel de solicitud de muestras: seleccionar la opción “MUESTRA”, selección del parámetro de interés (qbenzodicepinas, qTHC, qcocaina, qanfetaminas.)
- Presionar en nueva muestra para agregar otra muestra para analizar.
- Dar click cargar muestras: oprimir el botón “ENTER” para que el software asigne la posición y colocar las cubetas.
- Presionar iniciar medición: esperar a que el equipo concluya el análisis para visualizar el resultado en la pantalla “EVALUAR MUESTRA”.

Identificación de drogas de abuso (tetrahidrocannabinol, cocaína benzodicepinas y anfetaminas) en sangre.



FISCALÍA GENERAL DE JUSTICIA DEL ESTADO DE MÉXICO
COORDINACIÓN GENERAL DE SERVICIOS PERICIALES
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA FORENSE

Emisión: ENERO- 2020

Versión: 0001

Clave: EMIT-001-2020

Página 8 de 8

REFERENCIAS

- González, L., Rivas, N., & Farías, L. (2016). Estudio de alcance de terapia ocupacional y drogodependencias: reflexiones críticas de los contextos, prioridades y miradas en la investigación. *Revista Chilena de Terapia Ocupacional*, 16(2), 12–15. [Fecha de consulta 26 de junio del 2019]. Disponible en: <https://revistas.uchile.cl/index.php/RTO/article/view/44747>
- Giannuzzi, L., & Ferrari, A. (2006). *Manual de técnicas analíticas en el laboratorio de toxicología y química forense*. Buenos Aires. [Fecha de consulta 23 de agosto del 2019]. Disponible en: http://cqfp.pe/wp-content/uploads/pdf/toxicologia_may_2019/Manual_Toxicologia_editado_oct_2006_Luis_Ferrari.pdf
- Madea, B., & Frank, M. (2004). Postmortem toxicology. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 6(4), 71–72. [Fecha de consulta 17 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/journal/forensic-science-international/vol/142/issue/2>
- Palencia, A., & Romero, G. (2008). Las muestras en toxicología forense. Importancia de la cadena de custodia. *Revista de La Facultad de Ciencias de La Salud.*, 12(3), 52–58. [Fecha de consulta 22 de septiembre del 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=3759/375938988011>
- SIEMENS. (2015). EMIT II plus, Inserto. SIEMENS, 1 [Fecha de consulta 25 de agosto del 2019].
- Volkow, N. (2010). Cocaína : Abuso y adicción. *National Institute On Drug Abuse*, 2–4. [Fecha de consulta 12 de julio del 2019]. Disponible en: <https://d14rmgtrwzf5a.cloudfront.net/sites/default/files/rrcocaina.pdf>
- Volkow, N., Baler, R., Compton, W., & Weiss, S. (2014). Adverse health effects of marijuana use. *The New England Journal of Medicine*, 2219–2221. [Fecha de consulta 08 de julio del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24897085>
- Robledo, P. (2008). Las anfetaminas. *Trastornos Adictivos*, 10(3), 167–171. [Fecha de consulta 07 de agosto del 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-trastornos-adictivos-182-articulo-las-anfetaminas-13128591>
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoani, I., Moro, M., Leza, C., & Portolés, A. (2008). *Farmacología básica y clínica* (18a ed.). Madrid: Panamericana. [Fecha de consulta 18 de julio del 2019].