



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**T E S I N A**

**PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

*“ESTUDIO COMPARATIVO DEL INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO  
MULTIPLICADO, RADIOINMUNOENSAYO Y  
QUIMIOLUMINISCENCIA COMO METODOS PRELIMINARES  
PARA DETECTAR DROGAS DE ABUSO”*

**PACHECO MARTÍNEZ NANCY GRISELDA**

**ORIENTACION: BIOQUIMICA CLÍNICA**

**NOMBRE DEL DIPLOMADO: QUIMICA LEGAL**

**ASESOR: M. EN C. VALENTIN ISLAS PEREZ**

**MÉXICO D.F A 16 DE MARZO DEL 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Gracias a mis padres, por darme la vida y creer en mí y a todas las personas que siempre me apoyaron incondicionalmente.**

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
I. OBJETIVOS.....	4
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
III. MARCO TEORICO.....	6
A. Drogas de Abuso.....	6
1. Definición.....	6
2. Grupos de sustancias químicas consideradas como drogas de abuso.....	6
a. Opio.....	6
b. Psicoestimulantes.....	7
1) Cocaína y cocaína base.....	7
2) Anfetaminas.....	9
c. Canabinoides.....	10
B. Métodos para identificar drogas de abuso.....	15
1. Radioinmunoanálisis (RIA).....	17
a. Fundamento.....	18
b. Separación de las fases ligada y no ligada.....	19
1) Adsorción.....	19
2) Precipitación química.....	20
3) Precipitación inmunológica.....	20
4) Fase sólida.....	20
c. Construcción de la curva patrón.....	21
d. Reactivos de análisis.....	22
e. Ventajas.....	23
f. Desventajas.....	23

2. Inmunoensayo Enzimático Multiplicado (EMIT).....	24
a. Fundamento.....	25
b. Elección de enzimas para EMIT.....	26
c. Criterios para la elección de una enzima como marcador.....	27
d. Unión de los antígenos y anticuerpos con la enzima.....	27
e. Ventajas.....	30
f. Desventajas.....	30
3. Quimioluminiscencia (QL).....	31
a. Fundamento.....	33
b. Requisitos de la emisión QL.....	36
c. Factores que influyen en la emisión QL.....	37
d. Características de la QL como técnica analítica.....	37
e. Marcadores quimioluminiscentes.....	39
1) Luminol y sus derivados.....	39
2) Ester de acridina.....	40
3) Peroxioxalatos.....	40
f. Tipos de oxidantes utilizados.....	40
g. Instrumentación básica.....	41
h. Introducción de la muestra y los reactivos.....	42
i. Ventajas.....	43
j. Desventajas.....	43
C. Metodologías de las técnicas analíticas.....	44
1. Radioinmunoensayo.....	44
2. Ensayo Inmunoenzimático multiplicado.....	46
3. Quimioluminiscencia.....	47
IV. COMPARACIÓN ENTRE RIA, EMIT Y QUIMIOLUMINISCENCIA.....	49
V. DISCUSION DE RESULTADOS.....	50
VI. CONCLUSIONES.....	52
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	53

**RESUMEN:** Se realizó una investigación retrospectiva para comparar las ventajas y desventajas de los métodos seleccionados para este estudio que detectan drogas de abuso de manera presuntiva como lo es el Inmunoensayo Enzimático Multiplicado (EMIT), Radioinmunoensayo (RIA) y Quimioluminiscencia (QL) y de esta manera establecer cual de ellos ofrece la suficiente confiabilidad y sustento científico para ser utilizado de manera cotidiana en la detección de drogas en muestras biológicas que muchas veces se relaciona con algún hecho ilícito que impactara directamente en la vida ya sea social, familiar o laboral de la persona que se somete al análisis. Se estableció que el método de Quimioluminiscencia es el que ofrece el mejor sustento científico para ser utilizada de manera cotidiana en la detección de drogas en muestras biológicas, pues el tiempo de proceso, especificidad, sensibilidad y simplicidad del método así lo avalan.

## **INTRODUCCION.**

La mención del término detección de drogas de abuso en la orina es capaz de provocar debate y controversia, debido a que su uso se puede dar en el lugar de trabajo, en competencias deportivas y otras veces esta ligado al ámbito forense. Dentro de la comunidad científica, los debates van desde los mandatos normativos que rigen la seguridad de la muestra a los aspectos analíticos de las pruebas, mientras que en la comunidad jurídica y civil, el centro del debate es en torno a las cuestiones de privacidad, derechos, custodia y a la pérdida financiera.

La calidad científica de los resultados analíticos en los laboratorios forenses depende fundamentalmente de tres aspectos que tienen relación con el recurso humano, los métodos analíticos y los equipos de análisis, en los cuales están incluidos factores como la confiabilidad, rapidez del resultado, adiestramiento o capacitación en la misma y, en muchos casos, costo.

El desarrollo tecnológico de la toxicología, los avances en el campo analítico, las exigencias del sistema de administración de justicia, ordenan un esfuerzo por mantener un nivel tecnológico acorde con las demandas de la comunidad científica. Por esta razón, es necesario que los laboratorios de toxicología forense cuenten con las herramientas analíticas necesarias para el adecuado desempeño de su labor pericial. El trabajo forense en el ámbito de toxicología analítica exige el uso de métodos de detección rápida de drogas de abuso. Estos métodos conocidos como métodos de screening dan una primera información sobre la posible presencia de estas sustancias en la muestra para la cual ha sido validado el método.

En el presente trabajo se recopilara la información necesaria que nos permitirá comparar las ventajas y desventajas de los distintos métodos presuntivos automatizados que existen en el mercado, ya que es de suma importancia que el

resultado emitido por cada de uno de estos tenga validez científica comprobada y sustentable.

Ya que en la actualidad el uso indiscriminado de las llamadas drogas de abuso se ha convertido en un problema de índole social y familiar muy grave se vuelve imperativo detectar tempranamente a los probables consumidores de drogas, ya que muchas veces estos se encuentran implicados en hechos ilícitos, y a partir del resultado emitido aplicar una pena justa o deslindarlo del hecho y además de lo anterior es importante conocer que metodologías presuntivas existen en el mercado para detectar drogas de abuso o sus metabolitos, para que las instituciones o laboratorios que realizan dichas pruebas, decidan cual metodología es la que mas les conviene, ya sea por costo, tiempo de reacción o simplicidad, pues los resultados obtenidos deben de tener todo el respaldo científico al discernir entre las muestras positivas y negativas, que posteriormente pasaran a ser confirmadas por metodología mas sofisticada y de elevado costo.

## **I. OBJETIVOS:**

### **General**

- Identificar el método mas adecuado para detectar metabolitos de drogas de abuso.

### **Particulares**

- Revisar los fundamentos del Inmunoensayo Enzimático Multiplicado, Radioinmunoensayo y Quimioluminiscencia.
- Analizar las ventajas y desventajas de los principales métodos preliminares para la detección de drogas de abuso en orina.
- Evaluar cual de los tres métodos ofrece la mejor sensibilidad y especificidad para detectar las drogas de abuso.

## **I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La detección preliminar de metabolitos de drogas de abuso se realiza utilizando técnicas y procedimientos sencillos y rápidos, todos disponibles en el mercado, con resultados variables. Lo anterior complica la selección del método para la prueba preliminar, pues esta debe cumplir con determinadas características técnicas que le confieran confianza al realizar la prueba, como alta sensibilidad y especificidad, respaldadas siempre por un buen sustento científico, por lo cual es importante evaluar y comparar ventajas y desventajas de cada método, y así determinar cual de los tres métodos abordados es el más idóneo para ser utilizado rutinariamente en las instituciones o laboratorios que realizan análisis para detectar drogas de abuso en diversos fluidos.

## I. MARCO TEORICO

### A. DROGAS DE ABUSO

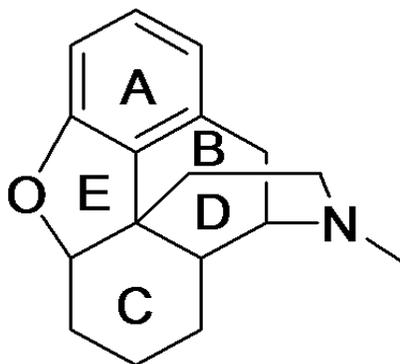
#### 1. DEFINICIÓN

El término "drogas de abuso" es definido por la Organización Mundial de la Salud como el tipo de sustancias que, introducidas en el organismo vivo, son capaces de modificar una o varias de sus funciones, siendo susceptibles de provocar dependencia y tolerancia y que se emplean voluntariamente para fines no justificados terapéuticamente. (Calubaig, Manual de drogodependencia).<sup>1</sup>

#### 2. GRUPOS DE SUSTANCIAS QUÍMICAS CONSIDERADAS COMO DROGAS DE ABUSO.

##### a. OPIO

El opio (**Figura. 1**) es el producto natural de un tipo de amapola llamada *Papaver somniferum*. Se da en zonas de Medio y Extremo Oriente y más limitadamente, en algunos territorios americanos.



**Figura 1. Estructura general del opio.**

Los tipos de opiáceos más importantes son: morfina (**Figura. 2**), codeína (**Figura. 2**), fentanilo, meperidina, metadona, heroína (**Figura 2**) y otros (oxycodona, hidromorfona, propoxifeno, pentazocina y dextrometorfano).<sup>4</sup>

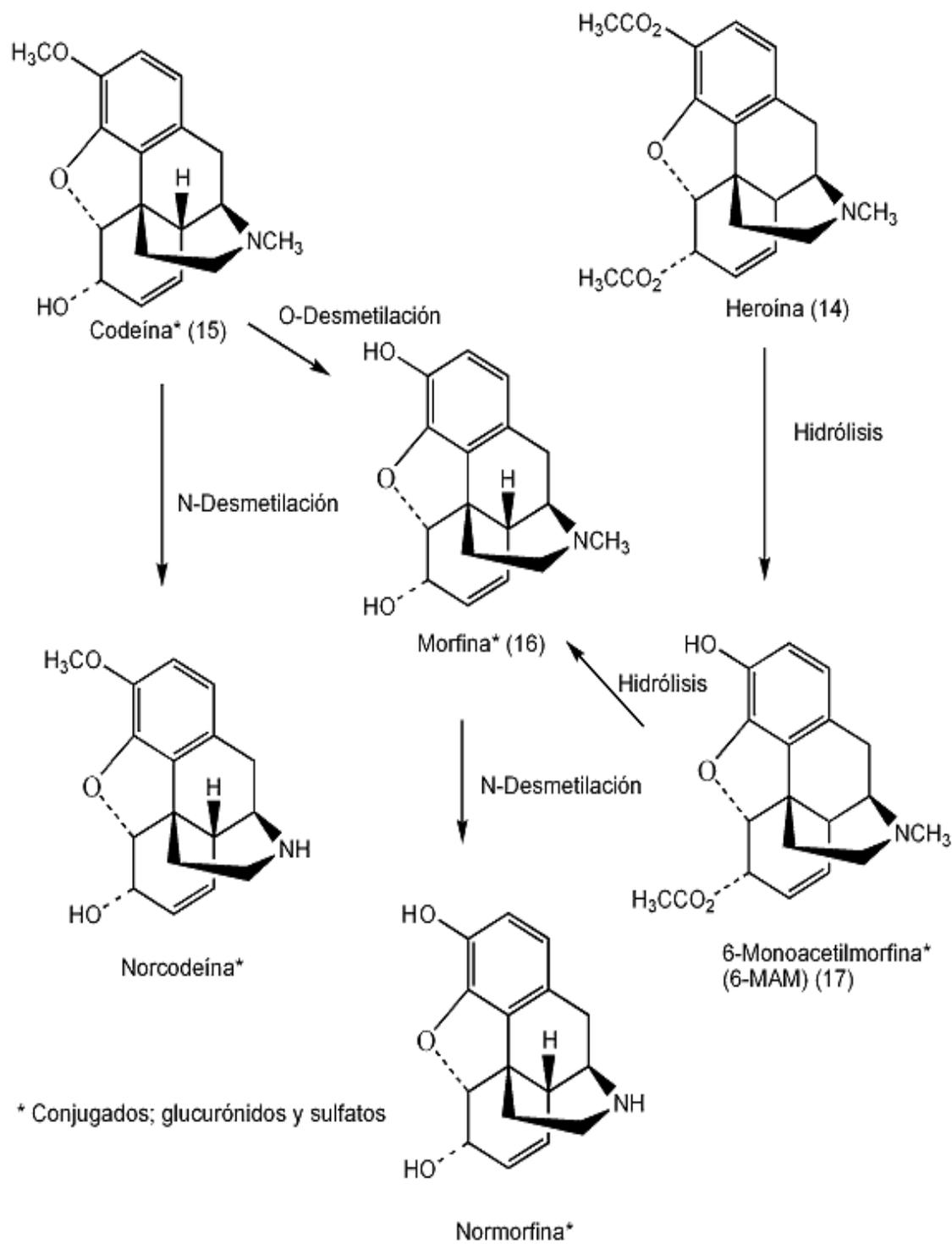


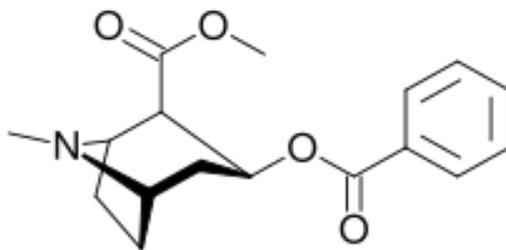
Figura 2. Estructuras químicas de los tipos de opiáceos más importantes

Los opiáceos actúan a nivel de los siguientes sistemas:

- ✓ Sistema nervioso central: analgesia sin pérdida de conciencia, somnolencia y cambios de status mental, euforia/disforia, náuseas/vómitos, miosis.<sup>4</sup>
- ✓ Sistema respiratorio: depresión respiratoria, gasometría compatible con hipoventilación, efecto dosis dependiente.<sup>4</sup>
- ✓ Efectos cardiovasculares (escasos): liberación de histamina, hipotensión ortostática, hipotensión, hipoxia, vasodilatación cerebral, toxicidad directa/hipersensibilidad a adulterantes.<sup>4</sup>
- ✓ Efectos gastrointestinales: descenso de motilidad intestinal.<sup>4</sup>

## b. PSICOESTIMULANTES

**1) Coca y cocaína base.** La cocaína (**Figura. 3**) es un potente estimulante del sistema nervioso central y una de las drogas más adictivas y peligrosas. Se trata de una droga que se obtiene a partir del procesamiento químico de las hojas del arbusto de coca *Erythroxylum coca*. A finales del siglo XIX, se consiguió aislar el principio activo contenido en estas hojas y surgieron diversas formas de consumo de la cocaína (esnifada, fumada, inyectada, etc.) que producen efectos más rápidos e intensos que la hoja mascada y por tanto aumentan el riesgo de desarrollar adicción y dependencia.<sup>4</sup>



**Figura 3. Estructura química de la cocaína.**

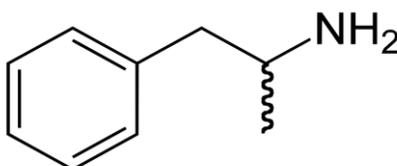
- ❖ Cocaína en polvo o clorhidrato de cocaína. Es la forma habitual de presentación de esta sustancia. Se suele consumir esnifada (aspirada

- ❖ por la nariz) y tiene unos efectos casi inmediatos que duran entre 2 y 3 horas. Aunque menos frecuentemente, también se usa por vía inyectada, en ocasiones mezclándola con heroína.<sup>4</sup>
- ❖ Pasta de coca: Es sulfato de cocaína y se fuma mezclado con tabaco o marihuana.<sup>4</sup>
- ❖ Crack o cocaína base: Se consume fumada y su efecto es rápido, intenso y breve. Es muy adictiva.<sup>4</sup>

Cuando se consume cocaína aumenta la actividad del sistema de neurotransmisión dopaminérgico que modula importantes procesos en nuestro organismo, y produce los siguientes efectos<sup>4</sup>:

- ✓ Estado de excitación motora y aumento del nivel de actividad de la persona.<sup>4</sup>
- ✓ Cambios emocionales variados que pueden llegar a provocar crisis de ansiedad u otras alteraciones.<sup>4</sup>
- ✓ Aumento inicial de la capacidad de atención y de la concentración, que permiten un aparente mayor rendimiento intelectual, aunque este efecto es pasajero.<sup>4</sup>
- ✓ Aumento de las frecuencias cardíaca y respiratoria así como de la tensión arterial, lo que favorece la aparición de enfermedades cardíacas y respiratorias.<sup>4</sup>

**2) Anfetaminas.** Las anfetaminas (**Figura. 4**) son aminas simpaticomiméticos, de fórmula química estructural semejante a la adrenalina. Entre las que se encuentran:



**Figura 4. Estructura química de la anfetamina.**

- ❖ Metanfetamina.

- ❖ Metilfenidato.
- ❖ Anfetaminas de diseño: MDA, MDMA (Éxtasis) y otras.
- ✓ Efectos psicológicos. Entre los más frecuentes se encuentran:

Agitación.<sup>4</sup>

Euforia.<sup>4</sup>

Incremento de autoestima.<sup>4</sup>

Alerta y vigilancia constantes.<sup>4</sup>

Agresividad.

- ✓ Efectos fisiológicos. Los efectos sobre el organismo del consumidor son, en esencia:

Falta de apetito.<sup>4</sup>

Taquicardia.<sup>4</sup>

Insomnio.<sup>4</sup>

Sequedad de boca.<sup>4</sup>

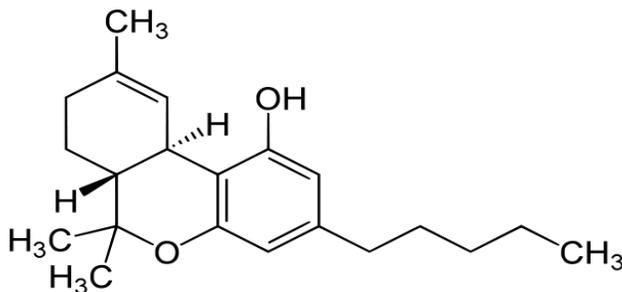
Sudoración.<sup>4</sup>

Incremento de la tensión arterial.<sup>4</sup>

Contracción de la mandíbula.<sup>4</sup>

### c. CANNABINOIDES

El cannabis es una droga que se extrae de la planta *Cannabis sativa*, con cuya resina, hojas, tallos y flores se elaboran las drogas ilegales más consumidas: el hachís y la marihuana. Sus efectos sobre el cerebro son debidos principalmente a uno de sus principios activos, el Tetrahidrocannabinol (**Figura. 5**) o THC, que se encuentra en diferentes proporciones según el preparado utilizado<sup>4</sup>:



**Figura 5. Estructura química del tetrahidrocannabinol.**

- ❖ Marihuana: obtenida de la trituración de flores, hojas y tallos secos, posee una concentración de THC entre el 1 y el 5%.<sup>4</sup>
- ❖ Hachis: elaborado a partir de la resina almacenada en las flores de la planta hembra, tiene una concentración de THC entre el 15 y el 50%.<sup>4</sup>
- ❖ Aceite de hachis: resina de hachis disuelta y concentrada, con una concentración de THC entre el 25 y 50%.<sup>4</sup>
- ✓ Cuando se consume cannabis, se activan neurotransmisores endógenos de forma externa y artificial y se alteran muchas de las funciones que desarrollan. A dosis pequeñas el efecto es placentero, mientras que a dosis altas puede producir cuadros de gran ansiedad, tras el consumo se produce sequedad de boca, enrojecimiento ocular, taquicardia, descoordinación de movimientos, risa incontrolada, somnolencia, alteración de la memoria, de la atención y de la concentración.<sup>4</sup>

No basta con que se decida mencionar estas drogas y clasificarlas, si no se insiste en el calificativo más peligroso que las caracteriza: la dependencia. Es por ello que al hablar sobre drogas de abuso, se impone definir la drogodependencia, para lo cual nos remitiremos al concepto vertido por expertos de la Organización Mundial de la Salud en 1974 y que aún mantiene su vigencia, a saber: *“Drogodependencia es un estado psíquico y algunas veces físico, resultante de la interacción entre un organismo vivo y un producto psicoactivo y que se caracteriza por modificaciones de la conducta y por otras reacciones que incluyen siempre un deseo invencible de consumir la droga, continua o periódicamente, a fin de experimentar nuevamente sus efectos psíquicos y evitar a veces el malestar de su privación.”*<sup>5</sup>

Salta a la vista en todo momento que al referirse a drogas de abuso, drogodependencia o uso indebido de drogas, se tiene en cuenta la psicoactividad y, por tanto, se trata de influencias ostensibles sobre la actividad del sistema nervioso central, pues el cerebro es el órgano blanco sobre el que actúan estas drogas y particularmente sobre la actividad de las neuronas de sus estructuras especializadas. Si del cerebro se trata, entonces los neurotransmisores

(entiéndase actividad de las sustancias químicas propias del tejido nervioso) serán los elementos principalmente afectados, puesto que de ellos depende el funcionamiento de los 12 mil millones de neuronas que se hallan interconectadas en el cerebro para recibir, procesar y emitir la información correspondiente para cada acción característica de las estructuras especializadas.<sup>5</sup>

Se han desarrollado diversos sistemas de detección de drogas de abuso, siendo los más comunes los métodos de Inmunoensayo. Los sistemas de análisis por inmunoensayo cuentan con el reconocimiento de la comunidad científica internacional como una herramienta básica en la búsqueda de drogas de abuso en muestras de orina, ya que poseen una alta sensibilidad y especificidad y tienen pocas reacciones cruzadas, además de permitir estimar la cantidad de droga presente en la orina. Esta herramienta es la base de la racionalización de los recursos de cualquier laboratorio que realiza análisis toxicológicos, ya que permite analizar en muy corto tiempo varios analitos, con lo que la productividad se ve evidentemente elevada.<sup>5</sup>

La selección de una metodología analítica para detectar metabolitos de drogas de abuso depende de varios factores como la cantidad de trabajo, la sensibilidad requerida, la confiabilidad, la capacidad técnica e instrumental, el tiempo disponible para el análisis y el costo. Un efectivo procedimiento analítico para la detección de drogas deberá consistir de un procedimiento inicial sensitivo de filtrado o selección de muestras, el cual distinguirá entre muestras negativas y probables muestras positivas que posteriormente deben ser confirmadas por métodos altamente específicos. Como es natural, la valoración de cada método deberá tener en cuenta algunas características como:<sup>6</sup>

➤ **Especificidad.**

Puede definirse como la capacidad de un sistema analítico de no dar resultados positivos en muestras que no contengan el analito a determinar.<sup>6</sup>

En los inmunoensayos esta característica es alta, debido al tipo de anticuerpos que se utilizan, en este caso monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se

diferencian de otros anticuerpos, en que son muy específicos para un epítotope simple en un antígeno multivalente. Se producen a partir de una línea celular simple usando tecnología para hibridomas y líneas celulares de mieloma de ratón. Las hibridomas son células tumorales productoras de anticuerpos que producen varias copias del mismo anticuerpo y se desarrollan fácilmente en poblaciones celulares de laboratorio.<sup>7</sup>

Una ventaja de los anticuerpos monoclonales es que la línea celular hibridoma que los produce es potencialmente “inmortal” y que puede producir los mismos anticuerpos en forma constante e indefinida.<sup>7</sup>

➤ **Sensibilidad.**

Está muy influenciada por el tipo de marcador usado. Puede definirse como la capacidad de un sistema de identificar la sustancia buscada en todas las muestras que realmente la contengan. Cuanto más sensible sea el sistema analítico, más pequeña será la cantidad de sustancia detectada. Esto significa que una prueba que tenga una sensibilidad de 25 ng/ml., estará en condiciones de detectar la droga o sus metabolitos durante un período de tiempo mas largo o bien en presencia de orina mas diluida con respecto a lo que puede detectar una prueba con una sensibilidad de 100 ng/ml.<sup>6</sup>

Por lo tanto, dado el tipo de funciones requeridas en “screening”, es importante que la prueba de presunción sea altamente sensible y que tal sensibilidad sea declarada por el fabricante.<sup>6</sup>

➤ **Valor de corte (cut-off).**

El valor de corte de una prueba, establece que concentración de la droga debe estar presente antes de que la muestra sea señalada como positiva por el sistema. Esto significa que una muestra considerada negativa, en realidad puede contener droga, pero con una concentración inferior al corte. Es obvio, que el valor del corte debe mantenerse por encima del valor de sensibilidad declarado; sin embargo, es deseable por otra parte, poder fijar el valor de corte en relación al tipo

de investigación que podrá ser de carácter médico-legal, epidemiológico, clínico, etc.<sup>6</sup>

➤ **Exactitud.**

La exactitud de un sistema analítico describe su habilidad intrínseca de identificar verdaderamente y/o cuantificar la sustancia a ser medida. El empleo de estándares primarios nos permite conocer que tan separado está el valor teórico del valor práctico obtenido.<sup>6</sup>

➤ **Confiabilidad.**

La confiabilidad de un sistema analítico describe el desempeño esperado como resultado de una exactitud y precisión consistente. La confiabilidad es afectada por las condiciones y los factores que influyen al sistema analítico y la exactitud de los resultados. El método es confiable, si el método de la prueba es exacto y preciso bajo cualquiera o la mayoría de las condiciones. Si hay un gran número de factores que disminuyen la exactitud y precisión la confiabilidad disminuye.<sup>6</sup>

➤ **Precisión.**

La precisión es una evaluación estadística que mide la repetitividad de los procedimientos de prueba. No indica la exactitud del sistema, ya que un sistema analítico puede ser muy preciso reproduciendo errores consistentemente, sin embargo; una medición exacta debe tener también una precisión aceptable.<sup>6</sup>

➤ **Interferencias.**

La interferencia es la consecuencia de sustancias en el sistema de prueba afectando adversamente la reacción química o medición de los productos de reacción. La interferencia puede provocar resultados falsamente elevados o resultados disminuidos. Las sustancias químicas que son estructuralmente similares o que producen reacciones químicas similares, algunas veces son identificadas junto con la droga de interés. Adicionalmente, sustancias presentes

en la muestra pueden enmascarar la presencia de la droga buscada. El impacto en los resultados afecta la especificidad y, por lo tanto, la exactitud del sistema analítico.<sup>6</sup>

➤ **Reactividad cruzada.**

Se llama reactividad cruzada a la tendencia de un método de prueba a reaccionar con más de una droga. Algunas veces llamada reactividad selectiva, la reactividad cruzada se utiliza para hacer la detección de muchos miembros de una familia de drogas con una sola prueba.<sup>6</sup>

Todas las técnicas presuntivas, tanto cualitativas como automatizadas, establecen una concentración de detección para cada droga o sus metabolitos, llamada límite de corte. Este valor es establecido por instituciones básicamente de carácter público y está fundamentado en la experiencia y evidencias científicas que demuestran una probabilidad baja de dictaminar como positivo un individuo expuesto de manera involuntaria a la droga (exposición pasiva).<sup>6</sup>

## **B. MÉTODOS PARA IDENTIFICAR DROGAS DE ABUSO**

En la mayoría de los laboratorios, se llevan a cabo pruebas de drogas en orina utilizando cromatografía o métodos basados en los inmunoensayos. Los métodos químicos o de espectrometría se pueden utilizar para cuantificar algunos medicamentos y drogas de abuso y, aunque son rápidos, baratos y fáciles de realizar, son los menos sensibles y específicos. Algunos de los productos químicos necesarios para el análisis se consideran peligrosos y, en el caso de las pruebas químicas, la interpretación de los resultados puede ser subjetiva. Por estas razones, pocos laboratorios utilizan estas pruebas.<sup>8</sup>

Numerosos ensayos se realizan utilizando cromatografía en capa fina, cromatografía de gases o cromatografía de líquidos de alta resolución. Estos métodos tienen la capacidad de identificar muchos medicamentos o drogas dentro de una muestra y tienen como tal, la habilidad de proyectar la verdadera droga

que se encuentra en la muestra. Si bien esto puede proporcionar algunas ventajas, el tiempo requerido para la preparación de la muestra y el análisis es largo, alrededor de 1 hora y por ello los tiempos de respuesta deseada para la mayoría de las emergencias no son alcanzables.<sup>8</sup>

Por muchas razones, los laboratorios de la actualidad están a favor de los métodos basados en el inmunoensayo para detectar drogas. Estos métodos fueron rápidamente adoptados por los laboratorios clínicos, debido a su facilidad de uso, los tiempos de respuesta rápida, la disponibilidad de las plataformas utilizadas para las pruebas químicas y los costos. Algunos de estos inmunoensayos se han modificado para dar cabida al análisis de otros tipos de muestra pero estas modificaciones rara vez son apoyadas por el fabricante y requieren validación.<sup>8</sup>

Los métodos presuntivos más utilizados para detectar drogas de abuso son: **Radioinmunoensayo (RIA), Quimioluminiscencia (QL) y el Inmunoensayo Enzimático Multiplicado (EMIT)**. Todos ellos se basan en general en los procedimientos inmunoquímicos clásicos y utilizan como principio analítico la reacción antígeno-anticuerpo. Utilizan 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.<sup>9</sup>

## 1. RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

Es una técnica inmunológica propuesta en 1959 por Yallow y Berson, que tiene una gran aplicación en clínica. Cuando se hace necesaria la medición de los niveles de drogas de abuso en la sangre, la orina o la saliva, el Radioinmunoensayo ha demostrado ser uno de los procedimientos más sensibles y específicos. Permite la cuantificación exacta de compuestos biológicos, fármacos y drogas de abuso presentes en el organismo en concentraciones tan bajas como ng/ml o pg. /ml, incluso hacerlo en mezclas con enormes cantidades y diversidad de materiales extraños, por lo que no es necesario purificar previamente la muestra.<sup>10, 11.</sup>

Otros métodos convencionales de análisis cuantitativo (como cromatografía de gases, cromatografía en capa fina etc.), son en general lentos, tediosos, y requieren un volumen de muestra relativamente grande (1-5 mL). Ninguno de estos métodos es práctico para los estudios fisiológicos, para el análisis de un gran volumen de muestras, ni están optimizados para la toxicología de emergencia.<sup>10, 11.</sup>

La primera vez que se realizó un trabajo sobre el uso del Radioinmunoensayo para la detección y medición de los niveles de una droga de abuso se hizo en 1970 para morfina en sangre y desde entonces el radioinmunoensayo se ha utilizado no solo para la detección de morfina, sino también de barbitúricos, anfetaminas, LSD, metacualona y benzoilecgonina.<sup>10,11.</sup>

El Radioinmunoensayo es un método sencillo, concreto, sensible y reproducible, por lo cual puede ser aplicado al análisis de rutina de un gran número de muestras, además de que no solo es importante para el tamizaje y determinación de la cantidad de una droga o drogas que circulan en el cuerpo después de una sobredosis, sino también para el estudio de los mecanismos fisiológicos de las diferentes drogas y sus metabolitos cuando se encuentran en los fluidos del cuerpo humano.<sup>10, 11.</sup>

### a. FUNDAMENTO

El radioinmunoensayo se basa en una reacción **antígeno-anticuerpo**. Los **anticuerpos** deben ser específicos contra la sustancia que queremos determinar, y tener una gran afinidad (**Figura.6**).

La cantidad de anticuerpo añadida al análisis es limitada, e inferior a la cantidad de antígeno total. Por lo que va a quedar saturado con él.

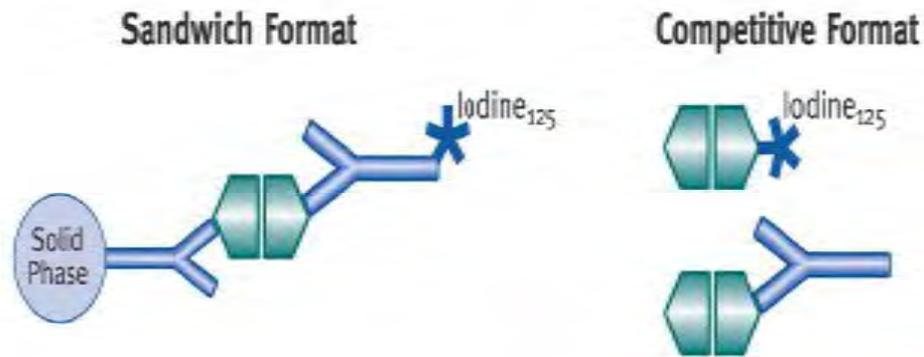
El antígeno es la sustancia biológica o droga (de la muestra) que queremos determinar (**antígeno frío**). Además del antígeno presente en la muestra problema, se va a añadir una cantidad constante y conocida de antígeno pero marcado (**antígeno caliente**).<sup>10, 11, 12</sup>

Los antígenos marcados se forman sustituyendo algunos de los átomos normales del antígeno por los correspondientes isótopos radiactivos ( $H^3$  o  $P^{32}$ ), o introduciendo radioisótopos extraños en la molécula como  $I^{125}$ .

Los dos tipos de antígenos, frío y caliente, van a competir, en igualdad de condiciones, por unirse con el anticuerpo disponible. Las concentraciones del antígeno marcado y del anticuerpo son constantes, la única variable del sistema es la concentración de antígeno no marcado (muestra problema).

Cuanto mayor sea la cantidad de antígeno frío en la muestra problema, este desplazará al antígeno caliente y por tanto se fijarán al anticuerpo cantidades menores de antígeno marcado.<sup>10, 11, 12</sup>

Así pues, la formación de complejos radiactivos ( $Ag^*-Ac$ ) varía en función de la concentración del antígeno no marcado: a mayor concentración de antígeno no marcado, mayor formación de complejos antígeno-anticuerpo no marcados, y menor formación de complejos radiactivos, y viceversa.<sup>10, 11, 12.</sup>



**Figura 6. Fundamento del Radioinmunoensayo.**

**b. SEPARACIÓN DE LAS FASES LIGADA Y NO LIGADA.**

Tras la reacción antígeno-anticuerpo, en el tubo de reacción encontraremos:

- ☞ Las fracciones libres, constituidas por antígeno frío y antígeno marcado.<sup>12</sup>
- ☞ Las fracciones ligadas formadas por complejo antígeno-anticuerpo y antígeno marcado-anticuerpo.<sup>12</sup>

Sin embargo, la radiactividad total en el tubo permanece constante antes y después de la reacción, por lo que hay que separar la fase ligada de la no ligada y contar la radiactividad en una de ellas, sin interferencia de la otra.

Hay diferentes métodos de separación que se basan en las distintas propiedades del antígeno libre y del complejo antígeno-anticuerpo.<sup>10, 11,12.</sup>

**1) Adsorción:** Con carbón activado, dextrano o resinas. Adsorben (se unen) específicamente la fase libre (antígenos frío y caliente) pero no se unen a los complejos antígeno-anticuerpo que quedarían en solución. Tras centrifugación, el carbón sedimenta en el fondo del tubo con la fase no ligada mientras que la fase ligada queda en el sobrenadante, que se aspira o decanta. Este método se utiliza cada vez menos.

**2) Precipitación química:** Hay sustancias como el etanol, el propilenglicol o el sulfato amónico que alteran la solubilidad de las proteínas provocando su precipitación. Precipitan los complejos ligados. Tras centrifugación, quedan los

complejos ligados en el sedimento y la fracción libre en el sobrenadante, que se elimina por aspiración o decantación.

**3) Precipitación inmunológica:** Se utiliza un segundo anticuerpo contra el anticuerpo del sistema. La unión del segundo anticuerpo al complejo antígeno-anticuerpo da lugar a un complejo de gran tamaño, en general insoluble y fácilmente precipitable. Tras incubación y centrifugación, la fase libre queda en el sobrenadante y se separa por aspiración o decantación. Este método es muy utilizado en RIA.

**4) Fase sólida:** Consiste en inmovilizar al anticuerpo a un soporte sólido, que puede ser la propia pared del tubo, bolitas de vidrio o partículas de Sephadex (polímero). La separación se consigue simplemente aspirando el medio de incubación. Este método tiende cada vez más a utilizarse por ser sencillo, práctico, más corto y requiere menos manipulación, e incluso permite su automatización.

Una vez separadas las fases, normalmente, se lee la radiactividad de la fase ligada utilizando un contador gamma  $\gamma$  (Figura 7), si el isótopo utilizado para el marcaje es  $I^{125}$ , o un contador beta  $\beta$  en el caso de haber marcado con tritio ( $^3H$ ). La medición de la actividad de un radioisótopo por centelleo líquido se basa en la cuantificación de tasa de luz emitida por una muestra líquida, ya que el centellador líquido actúa como transductor de energía transformando la energía de decaimiento del radioisótopo en luz. Esta es captada por tubos fotomultiplicadores que generan pulsos eléctricos, los cuales convenientemente amplificados, analizados y discriminados son clasificados de acuerdo a su amplitud y registrados.<sup>10, 11,12.</sup>



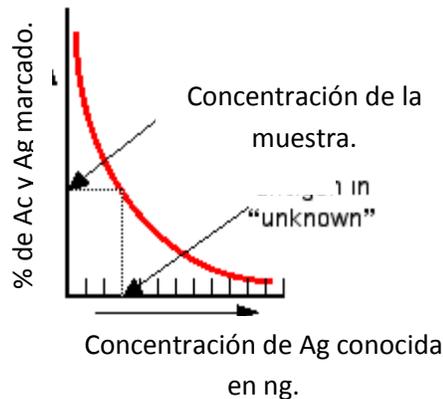
**Figura 7. Equipo de centelleo para RIA.**

### **c. CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA PATRÓN.**

Para poder relacionar los valores de radiactividad obtenidos con la concentración de hormonas, hay que construir una curva patrón que relacione estos parámetros (Figura. 8). La curva patrón se prepara al mismo tiempo que el análisis de las muestras problema, aplicando la técnica a una serie de tubos que contienen cantidades conocidas del analito a determinar (antígeno no marcado patrón) y las mismas cantidades de antígeno marcado y de anticuerpo que se usan en el análisis: <sup>14</sup>

- ▶ En el primer tubo no hay antígeno problema, por lo que todos los centros de unión del anticuerpo serán ocupados por el antígeno marcado. A este punto de máxima unión del antígeno marcado se llama  $B_0$ , que representa la radiactividad máxima que se puede unir. <sup>14</sup>
- ▶ Los siguientes tubos tienen concentraciones conocidas cada vez mayores de analito, a mayor concentración de antígeno no marcado menor formación de complejos antígeno marcado-anticuerpo, ya que ambos antígenos compiten por unirse al anticuerpo. <sup>14</sup>

Los resultados obtenidos nos permiten construir una curva patrón representando gráficamente la radioactividad obtenida (ó el % sobre  $B_0$ ) en estos tubos, frente a las concentraciones conocidas de antígeno no marcado contenida en cada uno de los tubos. <sup>14</sup>



**Figura 8. Curva patrón de RIA**

**d. REACTIVOS DE ANÁLISIS.**

Es necesario contar con una forma muy purificada del antígeno en cuestión para el marcaje. Las formas menos purificadas de antígeno pueden no servir perfectamente para usar como inmunógeno y estándar. Los requerimientos de pureza del material a marcar son muy estrictos, porque en última instancia lo que se mide es la radioactividad. Si ésta última se asocia en grado significativo con especies moleculares ajenas a la que va a medirse, en ese grado el análisis será no específico y quizás inútil. Por otra parte, siempre que el antígeno sea inmunógeno puede estar contenido en una mezcla relativamente muy impura, pues la especificidad de la inhibición de unión observada depende exclusivamente de la pureza de la especie marcada con el ligando presente.<sup>15</sup>

El requerimiento más crítico del ligando a usar como estándar en un análisis es que se comporte en el sistema de análisis en forma idéntica al comportamiento del ligando de interés en el líquido biológico analizado.

También un agente de unión con características apropiadas es indispensable para un buen análisis. Para sustancias de peso molecular bajo, especialmente aquellas en las que puede introducirse tritio por vías biosintéticas en niveles muy altos de actividad específica, este isótopo puede ser apropiado para usarse en análisis de unión competitiva, aunque el marcador de elección es el  $I^{125}$ , la vida media es de alrededor de 60 días y permite una gran actividad específica. Para la elección del agente de unión se tiene que tomar en cuenta diversos factores. Si el ligando en

cuestión es un inmunógeno potente, la producción de antisuero puede ser fácil y éste puede ser el método de elección. Si hay interés especial en medir la porción biológicamente activa de un grupo heterogéneo pero estrechamente relacionado de moléculas, un análisis radiorreceptor que emplea un receptor tisular puede ser el método de elección.<sup>15</sup>

Casi todos los análisis de unión competitiva son satisfactorios con valores de pH aproximados de 7.0 a 8.6 pero hay excepciones, y cuando se emprende un análisis es conveniente hacer por lo menos un experimento de dependencia del pH para asegurarse de que no habrá pérdida de tiempo experimental.

También se necesitan diversas sustancias recolectoras o limpiadoras que se emplean para saturar y limpiar sitios de absorción física y minimizar las pérdidas de reactivos críticos en plástico o vidrio.<sup>15</sup>

#### **e. VENTAJAS**

- Alta sensibilidad del orden de los ng o incluso pg.
- Permite cuantificar.
- Alta especificidad.
- Se pueden hacer la medición del analito incluso si se encuentra en una matriz muy compleja.

#### **f. DESVENTAJAS**

- Equipamiento costoso.
- Manejo de sustancias radioactivas peligrosas.
- Manejo de desechos.
- Personal altamente capacitado.
- Se requieren licencias sanitarias para el manejo de sustancias radioactivas.

## 2. INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO MULTIPLICADO (EMIT)

La técnica de ensayo inmunológico por multiplicación enzimática (EMIT) es un análisis homogéneo sin separación, en el cual se emplea una enzima conjugada al hapteno de interés como marcador en una reacción enzima-sustrato como sistema de detección. Este tipo de análisis lo describieron Rubenstein y colaboradores en 1972. Su principio es que se pueden determinar la cantidad de interacción entre el hapteno y el anticuerpo utilizando un marcador enzimático. Se ha desarrollado comercialmente, para la detección de drogas antiepilépticas, drogas cardioactivas, drogas anti-neoplásicas y de abuso.<sup>16</sup>

En general en este método se llevan a cabo reacciones competitivas entre el hapteno de la muestra y el hapteno conjugado con la enzima en un número limitado de sitios de enlace con el anticuerpo. El enlace del anticuerpo al hapteno conjugado con la enzima produce inhibición de la actividad enzimática. Esta inhibición se debe a que el anticuerpo interfiere estéricamente con el enlace del sustrato al sitio catalítico de la enzima o el enlace del anticuerpo transforma la configuración de la enzima. La cantidad de hapteno en la muestra determina el número de sitios para anticuerpos disponibles para enlazar e inactivar el hapteno conjugado con la enzima. A medida que hay más hapteno hay menos anticuerpo disponible para inhibir la actividad enzimática, por lo que el cambio de color se observa directamente proporcional a la cantidad de hapteno presente en la muestra.<sup>17</sup>

Estos ensayos han sido ampliamente evaluados y comparados con otros métodos disponibles (principalmente RIA, inhibición de la hemaglutinación, inmunoensayo spin, cromatografía, y espectrofluorimetría) con respecto a la sensibilidad, especificidad, la conveniencia y costo, las ventajas del inmunoensayo homogéneo son su velocidad (en la extracción o separación si es necesaria) y la gama de ensayos que están disponibles comercialmente. Las desventajas de esta técnica es que no es tan sensible como algunos de los otros métodos, es moderadamente caro con respecto a los instrumentos y su especificidad no es

absoluta. Además, las orinas con el paso del tiempo pueden sufrir un cambio en el pH, que afecta la actividad de la enzima utilizada en el marcaje y los falsos positivos pueden aparecer por la presencia de la lisozima en un pequeño porcentaje de orinas. La conclusión general de lo anterior es que el EMIT proporciona un método de cribado útil para medicamentos y drogas de abuso, pero, como en el caso de los inmunoensayos, todas las muestras positivas deben ser confirmadas por una metodología no inmunológica.<sup>18</sup>

### **a. FUNDAMENTO**

El análisis se basa en la competencia entre la droga muestra y la droga marcada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) u otra enzima por los lugares de unión del anticuerpo (Figura. 9). La actividad disminuye cuando la enzima se une al anticuerpo, y así la concentración de droga en la muestra puede medirse en base a la actividad enzimática. La enzima activa transforma la nicotinamida-adenin (NAD) en NADH, lo que causa un cambio en la absorbancia que puede medirse espectrofotométricamente. La G6P-DH sérica endógena no interfiere porque la coenzima funciona sólo con la enzima bacteriana de (*Leuconostoc mesenteroides*) que se emplea en el análisis.<sup>19</sup>

La competición se produce entre el Ag no marcado (analito de la muestra) y el Ag\*(marcado) por una cantidad limitante de Ac.

Los primeros inmunoensayos homogéneos se desarrollaron copulando una enzima al analito de bajo peso molecular (Ag\*) que se desea analizar en una muestra (Ag). En este tipo de ensayo, la unión del ligando-enzima al Ac produce un cambio en la actividad enzimática, por impedimento estérico causado por la unión del ligando al Ac. De esta manera el sitio activo de la enzima no puede interaccionar con su sustrato específico. La dosis respuesta es máxima cuando todo el ligando copulado a la enzima se halla en estado libre.<sup>20</sup>

La cuantificación se hace, por tanto, basándose en la medida de la actividad de la enzima ocupada para marcar. Tras la formación del complejo antígeno-anticuerpo, en el momento adecuado, se añade un sustrato que es catalizado por la enzima

transformándose en un compuesto coloreado lo que permite la medida de la actividad enzimática con ayuda de un espectrofotómetro. Esta medida de la actividad nos servirá para calcular la concentración de la molécula problema.

La presencia del anticuerpo y la actividad enzimática es proporcional a cantidad de analito libre. Las enzimas más utilizadas en este ensayo son la maleato deshidrogenasa y la 6-fosfato deshidrogenasa, ya que son poco afectadas por los constituyentes del suero. También se usan lisozima y galactosidasa.<sup>20</sup>

Con objeto de aumentar la sensibilidad de este análisis es frecuente utilizar el **sistema biotina-estreptavidina**, que actúa como mecanismo multiplicador. Así, por ejemplo, el anticuerpo está unido a varias moléculas de biotina. Cada molécula de biotina se une específicamente a varias moléculas de estreptavidina. El enzima está unido a la estreptavidina. De esta forma se consigue un efecto multiplicador de la señal.<sup>20</sup>

#### **b. ELECCIÓN DE ENZIMAS PARA EMIT**

En el ensayo EMIT no se incluye ninguna separación de los reactivos inmunes de las muestras antes del análisis enzimático, por lo que la elección de la enzima se restringe a un grupo mucho menos variable que las que pueden ser utilizadas para ELISA. Es de primordial importancia en EMIT que la enzima elegida no este presente en la muestra. También es recomendable que la muestra no contenga inhibidores de la enzima elegida, ni cantidades apreciables de sustrato de la enzima. Además, la enzima debe cambiar sus propiedades catalíticas en una forma medible después de la interacción con los anticuerpos. La mayoría de las enzimas no son inhibidas por los anticuerpos, sin embargo, las enzimas que actúan sobre sustratos de alto peso molecular, pueden ser obstaculizadas estéricamente y disminuir su actividad. Esta es la base para la utilización de lisozima en los inmunoensayos homogéneos enzimáticos. La situación es más compleja en el caso de otras dos enzimas, la malato deshidrogenasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que también son ampliamente utilizados en EMIT como se menciono anteriormente. La sustitución de los residuos en la molécula con hapteno aparentemente hace que la enzima sea más sensible a los cambios

conformacionales en la reacción con el anticuerpo, y esto conduce a la inhibición de la actividad enzimática.<sup>21</sup>

**Tabla 1. Enzimas utilizadas como marcadores en los inmunoensayos homogéneos.**

ENZIMA	FUENTE
Malato deshidrogenasa	Mitocondrias de corazón de cerdo.
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Glucosa oxidasa	Hongos
Peroxidasa	Rábano picante

**c. CRITERIOS PARA LA ELECCIÓN DE UNA ENZIMA COMO MARCADOR.<sup>22</sup>**

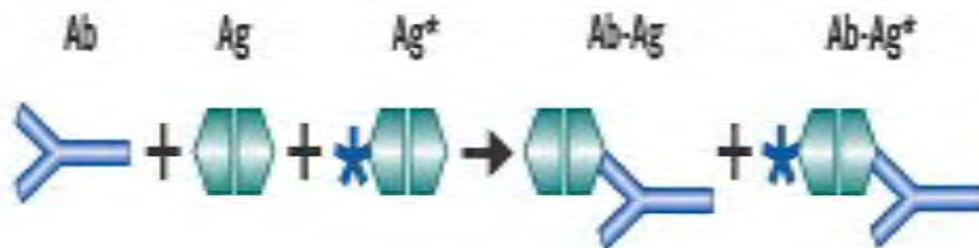
1. Disponible a bajo precio con una alta pureza.
2. Alta especificidad.
3. Estable bajo las condiciones del ensayo y de almacenamiento.
4. Soluble.
5. Ausente en los fluidos biológicos.
7. Los sustratos, inhibidores, y factores que puedan perturbar su actividad no deben de existir en los fluidos biológicos.
8. Capaz de mantener una adecuada actividad mientras se estén sometiendo a las reacciones de unión.

**d. UNIÓN DE LOS ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS CON LA ENZIMA.**

Existen muchos métodos para el acoplamiento de haptenos, proteínas y carbohidratos a otras proteínas. Una revisión extensa de las reacciones de acoplamiento proteína-proteína ha aparecido recientemente y podría utilizarse

como una fuente adicional sobre los detalles químicos de los métodos de acoplamiento.<sup>22</sup>

Los reactivos para el acoplamiento proteína-proteína que reaccionan en este proceso por lo general no son específicos con los grupos funcionales que son comunes en todas las proteínas. El alcance en el lugar de unión inter e intramolecular dependerá del número relativo y la disponibilidad de dichos grupos funcionales en las dos proteínas que se conjugan. El número total de los grupos funcionales presentes en cualquier proteína dada se puede determinar, pero si están disponibles para el entrecruzamiento intermolecular a otra proteína no es tan fácil de probar. Las condiciones óptimas para la conjugación de dos proteínas, por lo tanto, tienen que ser determinada por ensayo y error. La sustancia mas comúnmente usado para este fin es el glutaraldehído.<sup>22</sup>



**Figura 9. Fundamento de EMIT.**

La sensibilidad del EMIT está determinada por:

1. El límite de detección de la enzima conjugada,
2. Por el cambio en la actividad de la enzima conjugada luego de la unión al Ac,
3. Por la constante de afinidad del Ac en la reacción y
4. Por la presencia de alguna sustancia que pueda interferir en la actividad de la enzima como enzimas endógenas, etc.



**Figura 10. Instrumento Beckman- Coulter para EMIT.**



**Figura 11. Instrumento ETS para EMIT.**

#### **e. VENTAJAS**

- Ensayos muy sensibles que pueden ser desarrollados por el efecto amplificante de la enzima usada.
- Los reactivos son relativamente baratos y pueden tener una prolongada vida media.

- Pueden desarrollarse simultáneamente múltiples ensayos.
- Pueden desarrollarse una gran variedad de modificaciones.
- El equipamiento no es costoso.
- No se utilizan reactivos radioactivos.

#### **f. DESVENTAJAS**

- La medición de la actividad enzimática puede ser, en algunos casos más compleja que la medición de algunos radioisótopos.
- La actividad enzimática puede ser afectada por algunos constituyentes plasmáticos o de la orina.
- Algunos ensayos homogéneos no son tan sensibles como los RIA.

### 3. QUIMIOLUMINISCENCIA (QL)

El uso analítico de la quimioluminiscencia (QL) está experimentando un creciente interés, ya que representa una alternativa simple, barata y sensible para cuantificar una gran variedad de compuestos. Desde hace unos treinta años, el fenómeno de la luminiscencia originalmente una curiosidad del laboratorio físico, se ha convertido en una rama de la espectrometría aplicada, dentro de la química analítica. Debido a la nueva instrumentación y, especialmente a la incorporación de técnicas modernas, algunas nuevas y otras tomadas de otras disciplinas, la QL y la bioluminiscencia (BL) se aplican de forma rutinaria en el análisis tanto cualitativo como cuantitativo.<sup>23, 24, 25</sup>

Aunque el fenómeno de la QL se conoce desde hace 300 años a.C., el desarrollo de aplicaciones analíticas es relativamente reciente. Debido a su alta sensibilidad y selectividad, los métodos basados en detecciones QL suponen una herramienta analítica de gran utilidad. La primera aplicación de la QL como técnica analítica la llevó a cabo Erdey en 1957, que estudió el uso de varias sustancias, como luminol, lofina y lucigenina, como indicadores volumétricos.<sup>23, 24, 25.</sup>

Las investigaciones sobre el potencial analítico de la QL para análisis de rutina datan de los años 70, en el caso de reacciones en fase gaseosa, y de la década de los 80 para reacciones en fase líquida. Desde entonces, los métodos quimioluminiscentes han sido más ampliamente utilizados, fundamentalmente en análisis bioquímico y ambiental, y el número de publicaciones y comunicaciones sobre el tema ha ido incrementando de forma exponencial desde la celebración del primer Simposio Internacional sobre Bioluminiscencia y Quimioluminiscencia, celebrado en Bruselas en 1978.

De hecho, en el desarrollo de métodos QL pueden diferenciarse dos periodos: una primera etapa (1928-1940) caracterizada por la búsqueda de nuevos compuestos o sistemas quimioluminiscentes, por medio de modificaciones químicas de estructuras bien conocidas, y, desde la 2ª Guerra Mundial hasta el presente, un avance en la instrumentación, junto con el desarrollo de conceptos teóricos de los,

a veces, complejos principios de la QL. Las grandes aplicaciones analíticas de la QL como método de detección en inyección en flujo, cromatografía líquida (CL) y electroforesis capilar (EC), junto con el gran potencial del inmunoensayo, hacen de esta técnica un campo de investigación muy interesante en una amplia variedad de disciplinas, que incluyen técnicas de separación en análisis químico, biológico, farmacéutico, biomédico alimentario y control de calidad, etc.<sup>22, 23, 24</sup>

El número de reacciones quimioluminiscentes citadas en bibliografía, con aplicaciones en química, biomedicina, alimentación, medioambiente y toxicología, se ve incrementado anualmente. Combinado con separaciones por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) , se han empleado varias reacciones quimioluminiscentes, entre otras con peroxioxalato, luciferasa, lucigenina y luminol, siendo la más común la reacción con peroxioxalato en detección post-columna acoplada a cromatografía líquida, tanto convencional como empleando microcolumnas. Asimismo, se han empleado sistemas de flujo continuo con detección basada en QL, para la determinación de varios fármacos y analitos de interés biológico.<sup>23, 24, 25.</sup>

Hoy en día, el interés analítico de la QL está aumentando considerablemente debido a las ventajas ya comentadas, como bajos límites de detección, rangos dinámicos amplios, alta sensibilidad y la gran versatilidad de los métodos QL.

Recientemente, las investigaciones se están centrando especialmente en el desarrollo de productos quimioluminiscentes para aplicaciones de diagnóstico clínico; así, la QL es hoy en día un posible sustituto del marcado isotópico, remplazando así el uso de radioisótopos. La QL se aplica también en el control de calidad de productos cárnicos y residuos, existiendo igualmente aplicaciones en la medida del ozono ambiental.<sup>23, 24, 25.</sup>

**La QL se define como la emisión de radiación electromagnética (normalmente en la región del visible o del infrarrojo cercano) producida por una reacción química (no hay excitación luminosa como en la fluorescencia). Cuando esta emisión proviene de organismos vivos o sistemas derivados de**

ellos, se denomina bioluminiscencia. Ambos fenómenos son procesos luminiscentes que se han identificado tradicionalmente mediante un prefijo que identifica la fuente de energía responsable del inicio de la emisión de radiación electromagnética.<sup>23</sup>

Como la intensidad de emisión es función de la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción QL, las medidas de la intensidad de emisión pueden emplearse con fines analíticos. Una ventaja de las técnicas QL es que permiten emplear una instrumentación básica bastante sencilla, ya que el sistema óptico no requiere fuente externa de excitación. La QL se describe a menudo como una técnica de “campo oscuro”: la ausencia de niveles altos de luz de fondo, que sí ocurren en espectrofotometría y fluorimetría, reduce el ruido y permite mejorar los límites de detección. La instrumentación para medidas de QL varía desde sistemas muy simples hasta instrumentación más compleja, pudiéndose usar un fluorímetro simplemente con la fuente de excitación apagada.<sup>23, 24,25.</sup>

No obstante deben considerarse algunas limitaciones en el análisis por QL, como la dependencia de la emisión quimioluminiscente de varios factores ambientales que deben ser controlados, la falta de selectividad, ya que un reactivo quimioluminiscente no se limita a un único analito, y finalmente, como ocurre en otros sistemas de detección en flujo, la emisión quimioluminiscente no es constante sino que varía con el tiempo (el flash de luz está compuesto de una señal que se produce tras la mezcla de los reactivos, alcanza un máximo y después cae hasta la línea de base), este perfil de emisión frente al tiempo puede variar ampliamente en diferentes sistemas quimioluminiscentes, por lo que hay que extremar el cuidado para detectar la señal en sistemas en flujo, midiendo en periodos de tiempo bien definidos.<sup>23, 24, 25.</sup>

#### **a. FUNDAMENTO**

En general, una reacción de quimioluminiscencia (QL) puede generarse mediante dos mecanismos básicos (**Figura. 12**).





**Figura 13. Instrumento Advia Centauro para Quimioluminiscencia**



**Figura 14. Instrumento Liaison para Quimioluminiscencia**

## b. REQUISITOS DE LA EMISIÓN QL

Para que una reacción química emita luz, debe reunir algunos requisitos básicos:

- a) La reacción debe ser exotérmica y producir la suficiente energía para formar el estado electrónicamente excitado. En este sentido, para que ocurra una reacción quimioluminiscente, los requisitos energéticos pueden establecerse en términos de  $\Delta G$  (Kcal.mol<sup>-1</sup>):<sup>23</sup>

$$\Delta G \geq hc / \lambda_{\text{ex}} = 2.86 \times 10^4 / \lambda_{\text{ex}}$$

Donde  $\lambda_{\text{ex}}$  es la longitud de onda límite (nanómetros) para la excitación de las especies luminiscentes. Como la mayoría de las reacciones quimioluminiscentes producen fotones en el rango comprendido entre 400 -750 nm, la formación del estado electrónicamente excitado y la generación de QL en la región del visible requiere alrededor de 40-70 Kcal.mol<sup>-1</sup>. Esta condición exotérmica se asocia a las reacciones redox que emplean oxígeno, peróxido de hidrógeno u oxidantes de potenciales similares.<sup>23, 24</sup>

- b) El camino de reacción debe ser favorable a canalizar la energía hacia la formación de un estado electrónicamente excitado. En el caso de que la energía química se disipe en forma de calor, mediante vibraciones o rotaciones moleculares, la reacción no será quimioluminiscente.<sup>23</sup>
  
- c) La emisión de un fotón debe ser un proceso de desactivación del producto excitado favorable en relación a otros procesos no radiantes que pueden aparecer en pequeña proporción, como disociación molecular, reacciones químicas con otras especies, transferencia de energía intra o intermolecular, isomerización o atenuación física.<sup>23</sup>

### **c. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EMISIÓN QL**

Las medidas de QL están fuertemente influenciadas por aquellos factores experimentales que afectan al rendimiento cuántico y a la velocidad de reacción, como son:

- ☞ La estructura química del precursor quimioluminiscente, no solamente la parte que contiene al grupo excitado electrónicamente, sino también las cadenas laterales.
- ☞ La naturaleza y concentración de otras sustancias que afectan el proceso de QL y que favorecen otros procesos competitivos no radiantes.
- ☞ El catalizador seleccionado.
- ☞ La presencia de iones metálicos, especialmente metales de transición implicados en el proceso de oxidación.
- ☞ La temperatura
- ☞ pH y fuerza iónica
- ☞ La hidrofobicidad del disolvente y la composición de la disolución.
- ☞ La presencia de aceptores de la energía transferida.

### **d. CARACTERÍSTICAS DE LA QL COMO TÉCNICA ANALÍTICA.**

Como la velocidad de la reacción es función de las concentraciones de reactivos, la QL es una técnica adecuada para el análisis cuantitativo. La utilidad de los sistemas quimioluminiscentes en química analítica se basa en algunas características especiales, que se comentan a continuación.

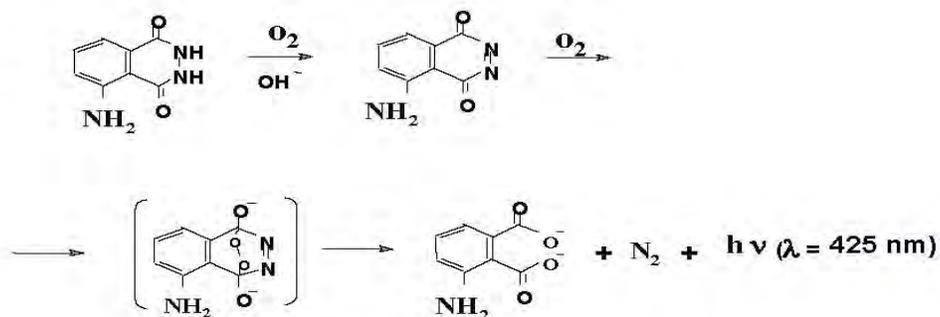
- ▶ La técnica comprende simultáneamente características cinéticas y luminiscentes, por lo que proporciona una alta sensibilidad y un amplio rango dinámico. Se pueden alcanzar límites de detección excelentes, en el rango de los femtomoles. La QL es aproximadamente  $10^5$  veces más sensible que la espectrometría de absorción y al menos  $10^3$  veces más sensible que la fluorimetría.<sup>23, 24, 25</sup>
  
- ▶ Comparada con los procesos de fotoluminiscencia, no se requiere fuente de excitación externa, lo que ofrece algunas ventajas, como la ausencia de dispersión y señales fotoluminiscentes de fondo, la desaparición de problemas relacionados con la inestabilidad de la fuente externa, reducción de interferencias debidas a procesos de excitación no selectivos, y una instrumentación más simple.<sup>23,24, 25</sup>
  
- ▶ La selectividad y la linealidad son más dependientes de la reacción y de las condiciones de reacción escogidas. Como ocurre con los procesos fotoluminiscentes, la absorción o emisión de radiación por el analito, producto o cofactores, pueden causar pérdida de linealidad o interferencias espectrales.<sup>23, 24, 25</sup>
  
- ▶ La técnica es versátil para la determinación de una amplia variedad de especies que pueden participar en el proceso quimioluminiscente, como: substratos o precursores quimioluminiscentes responsables del estado excitado; el reactivo necesario para la reacción (normalmente un oxidante); algunas especies que afectan la velocidad o la eficacia de la reacción: activadores, como catalizadores (enzimas o iones metálicos), o inhibidores, como reductores que disminuyen la emisión quimioluminiscente; fluoróforos en el caso de QL sensibilizada; algunas especies que no están directamente implicadas en la reacción QL pero que pueden reaccionar con otros reactivos en reacciones acopladas para generar un producto que es un reactivo en la reacción QL; especies que pueden formar derivados con algún precursor quimioluminiscente o fluoróforo, determinándose mediante QL directa o sensibilizada.<sup>23, 24</sup>

- ▶ Dependiendo de la naturaleza del analito y de la reacción QL, el incremento o disminución de la intensidad de QL estará directamente relacionada con la concentración de analito.<sup>23,24</sup>
- ▶ Las reacciones quimioluminiscentes pueden acoplarse fácilmente como método de detección en cromatografía o inmunoensayo, proporcionando información cualitativa o cuantitativa sobre una gran variedad de especies en las fases gaseosa y líquida.<sup>23,24</sup>

Como regla empírica, es probable que un compuesto exhiba QL cuando él o su producto derivado muestren propiedades fluorescentes. Es posible que la oxidación de tal especie produzca QL, aunque hay muchas excepciones a esta regla general.<sup>23</sup>

### e. MARCADORES QUIMIOLUMINISCENTES

1) **Luminol y sus derivados:** Químicamente es una dialcilhidracida cíclica cuyas características luminiscentes dependen mucho de la posición del grupo amino (Figura. 15). La eficiencia, la longitud de onda y el pH óptimo de emisión dependen mucho de las condiciones de la reacción. La reacción del luminol y sus derivados en solución acuosa precisan de un oxidante fuerte ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$  o  $\text{MnO}_4^-$ ) y de un catalizador, comúnmente el mejor catalizador es el grupo hemo, el mejor pH para la reacción es 11.



**Figura 15. Estructura química de luminol**

**2) Ester de acridina:** Esta molécula presenta ventajas frente al luminol, debido a que la reacción quimioluminiscente ocurre con la simple presencia de  $H_2O_2$  en medio alcalino. Esto simplifica el proceso de medida y disminuye las posibles interferencias procedentes de la muestra.<sup>23</sup>

**3) Peroxioxalatos:** En QL indirecta, uno de los sistemas no biológicos más frecuentemente utilizados se basa en la reacción quimioluminiscente de los peroxioxalatos (PO-CL), que supone la oxidación por peróxido de hidrógeno de un éster aril oxalato en presencia de un fluoróforo. La reacción parece que sigue un mecanismo denominado “luminiscencia de intercambio electrónico iniciada químicamente”, a través de un intermediario de alta energía, la 1,2-dioxietanodiona, forma un complejo de carga con el fluoróforo, donando un electrón al intermediario. Este electrón es transferido al fluoróforo, que alcanza un estado excitado y al regresar al estado fundamental, produce una emisión característica propia de la naturaleza del fluoróforo. La principal desventaja de este sistema reside en la insolubilidad de estos compuestos en agua y su inestabilidad por hidrólisis, por lo que se requiere el uso de disolventes orgánicos, tales como, acetonitrilo, dioxano, terbutanol y acetato de etilo. Esta reacción se aplica a la determinación de un gran número de compuestos como peróxido de hidrógeno, sustancias altamente fluorescentes (ejemplo. hidrocarburos aromáticos policíclicos) o compuestos que no siendo fluorescente pueden convertirse en fluorescentes, por reacción química con cloruro de dansilo (aminoácidos, esteroides, aminas alifáticas, ácidos carboxílicos, etc.) o con fluoescamina (catecolaminas).<sup>23, 24</sup>

#### **f. TIPOS DE OXIDANTES UTILIZADOS**

En los últimos años, se han desarrollado nuevas reacciones quimioluminiscentes por reacción del analito en cuestión con oxidantes fuertes, tales como  $MnO_4^-$  ( en medio ácido y alcalino),  $ClO^-$ ,  $Ce(IV)$ ,  $H_2O_2$ ,  $IO_4^-$ ,  $Br_2$ , N-bromosuccinimida, y con reductores, en diferentes condiciones químicas. Normalmente, si se conoce que la oxidación de la molécula da un producto fluorescente, o si el analito en si mismo, tiene una estructura que permita la emisión fluorescente, hay posibilidad de que la

oxidación del mismo produzca emisión de QL. Algunas de las aplicaciones de estos últimos sistemas han sido la determinación quimioluminiscente de morfina, hidroclicloruro de buprenorfina y la benzodiazepina, mediante análisis por inyección en flujo (FIA). En estos casos, la muestra conteniendo el fármaco se inyectaba en el canal por donde circula una disolución de ácido fosfórico que posteriormente se mezclaba con el oxidante, proporcionando un procedimiento sumamente simple, económico y efectivo. Desde entonces, un gran número de este tipo de reacciones han sido publicadas, principalmente en el análisis de fármacos. Para aumentar la emisión de QL se han añadido a estos sistemas sensibilizadores, medios micelares o catalizadores.<sup>23, 24</sup>

### **g. INSTRUMENTACIÓN BÁSICA**

La medida de la luz emitida por una reacción química o bioquímica está relacionada con la concentración de las especies participantes: la producción total de luz está directamente relacionada con la cantidad de luz emitida y, consecuentemente, es proporcional a la concentración de la especie concreta. Por esta razón, la medida de luz emitida es un indicador de la cantidad de analito presente y al instrumento básico que es capaz de realizar estas medidas se le llama luminómetro. Una de las ventajas más importantes de la QL como técnica analítica es la simplicidad de la instrumentación, que incluye como componentes principales: una célula de reacción, un compartimento cerrado a la luz, un dispositivo de inyección y mezcla de reactivos y/o de muestra, un detector de luz y un sistema de adquisición y procesador de señal.<sup>23, 24, 25</sup>

En las técnicas de QL, una vez mezclados los reactivos y la muestra comienza la reacción quimioluminiscente y la intensidad de la emisión que se está produciendo, disminuye una vez que los reactantes se han agotado. Esto supone que el carácter de la emisión quimioluminiscente es transitorio, y que la escala de tiempo depende de la reacción en cuestión, que va de un corto flash a una emisión continua. Este hecho es crucial para la selección del sistema más conveniente para la incorporación de los reactivos. La función del compartimento es mantener

la mezcla de reactivo y muestra, a una temperatura adecuada y en completa oscuridad a fin de aislar el detector de la luz externa.

Normalmente no es necesario el uso de monocromadores porque la intensidad de QL que surge de una de las especies no se ve apenas afectada en su distribución espectral, por la presencia de otras especies.

#### **h. INTRODUCCIÓN DE LA MUESTRA Y LOS REACTIVOS**

Dependiendo de la configuración del dispositivo y del método de introducción de muestra y reactivos, los sistemas pueden clasificarse en: estáticos o sistemas en flujo.

En los sistemas estáticos, pequeñas porciones de muestra y reactivo CL se mezclan rápidamente en la cubeta de reacción, frecuentemente a temperatura controlada. Normalmente el reactivo final que inicia la reacción CL se adiciona con una jeringa o usando un inyector automático para conseguir una velocidad y volumen de inyección más reproducibles y una mejor sincronización de la adquisición de datos desde el inicio de la reacción. La mezcla de los reactivos y la muestra se produce por la fuerza de la inyección, aunque a veces, se puede utilizar un agitador magnético.<sup>23, 24</sup>

En estos casos, se registra la curva completa de intensidad de emisión de QL en función del tiempo de reacción. Dependiendo de la situación, la señal analítica puede ser tomada como la intensidad máxima de QL (altura máxima del pico), la señal después de un tiempo fijado desde el momento de la mezcla, la integral de la señal en un determinado periodo tiempo o la integral del pico completo (el área completa).

En cualquiera de los casos, las medidas estarán relacionadas de manera lineal con la concentración de analito. Esta técnica se usa en reacciones selectivas en disolución que muestran un alto rendimiento cuántico o un largo tiempo de emisión, como las reacciones bioluminiscentes, el inmunoensayo quimioluminiscente o ensayos de ácidos nucleicos.<sup>23, 24</sup>

### **i. VENTAJAS**

- Permiten emplear una instrumentación básica bastante sencilla, ya que el sistema óptico no requiere fuente externa de excitación.
- Los inmunoensayos por quimioluminiscencia evitan los desechos tóxicos y los resultados que se obtienen son equiparables con Radioinmunoanálisis.
- Estos sistemas son accesibles, conservando los reactivos en buen estado con el mínimo de manipulación por parte del operador, evita la necesidad de reinicializar el equipo para las pruebas, con lo que se puede disponer del equipo en cualquier momento.
- Es una alternativa simple y barata para cuantificar una gran variedad de compuestos.
- No genera riesgo contaminante ni ruido de fondo a la hora de efectuar el proceso del análisis de una muestra, control o estándar.
- Proporciona una selectividad y sensibilidad analítica excelente.
- Tiene bajos límites de detección y rangos dinámicos amplios.

### **j. DESVENTAJAS**

- Depende de la emisión quimioluminiscente de varios factores ambientales que deben ser controlados. (Temperatura, humedad, etc.).
- La falta de selectividad, ya que un reactivo quimioluminiscente no se limita a un único analito.
- Y finalmente, como ocurre en otros sistemas de detección en flujo, la emisión quimioluminiscente no es constante sino que varía con el tiempo. (como la luz está compuesta de una señal que se produce tras la mezcla de los reactivos, alcanza un máximo y después decae hasta la línea de base).

## **C. METODOLOGIAS DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS**

### **1. RADIOINMUNOENSAYO**

#### **↗ Precauciones de empleo.**

- Nunca utilice la pipeta con la boca.
- No fume, coma ni beba en aquellas zonas donde se manipulen muestras o equipos reactivos.
- Utilice guantes desechables siempre que manipule muestras o equipos reactivos y lávese las manos cuidadosamente al terminar.
- Evite las salpicaduras. Descontamine y deseche las muestras y todos los materiales potencialmente contaminantes como si contuvieran agentes infecciosos.

#### **↗ Reglas básicas de radioprotección.**

- Solo pueden recibir, comprar, almacenar o utilizar este producto radioactivo las personas autorizadas al efecto y en los laboratorios cubiertos por dicha autorización. Bajo ningún concepto debe administrarse esta solución a personas ni animales.
- La adquisición, almacenamiento, uso o intercambio de productos radioactivos están sujetos a la legislación vigente en el país del usuario.
- El cumplimiento de las reglas básicas para la manipulación de productos radioactivos garantiza una seguridad adecuada.
- Los productos radioactivos deben conservarse en los contenedores originales y en una zona adecuada.
- Debe llevarse un registro actualizado de la recepción y almacenamiento de productos radioactivos.
- La manipulación de productos radioactivos debe realizarse en una zona adecuada y de acceso restringido (zona controlada).

-Debe evitarse todo contacto directo con los productos radioactivos utilizando batas de laboratorio y guantes de protección.

-El material de laboratorio y de vidrio contaminado debe desecharse inmediatamente después de la contaminación para evitar la contaminación cruzada de diferentes isótopos.

-Ante cualquier tipo de contaminación o de pérdida de sustancia radioactiva debe actuarse de conformidad con los procedimientos establecidos. Toda evacuación de desechos radioactivos debe llevarse a cabo siguiendo la normativa en vigor.

### Procedimiento

#### Material necesario

-Micropipetas de precisión o material similar con puntas desechables, que permitan pipetear 50 µL, 300 µL, 500 µL y 2 mL ( $\pm 1\%$ ).

-Agua destilada, tubos de plástico desechables, contador de centelleo gamma calibrado para el conteo de  $I^{125}$ .

#### Protocolo.

-Todos los reactivos deben llevarse a temperatura ambiente ( $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ ) al menos 30 minutos antes de ser utilizados.

-La reconstitución y pipeteo de los reactivos en los tubos también se realizan a temperatura ambiente ( $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ ).

-Para el ensayo son necesarios los grupos de tubos siguientes:

Grupo estándar 0 para la determinación de la unión no específica.

Grupos estándar para determinar la curva estándar.

Grupo de control para realizar el control.

Grupos Sx para las muestras a analizar.

-Se recomienda realizar los ensayos por triplicado en el caso de los estándares y por duplicado con las muestras.

-Observe el orden en que deben utilizarse los reactivos:

Distribuya 50  $\mu$ L de estándares, de control o de muestras en los grupos de tubos correspondientes.

Añada 300  $\mu$ L de trazador en cada tubo.

**Incube durante 2 horas**  $\pm$  5 minutos a temperatura ambiente, con agitación.

Lave los tubos recubiertos siguiendo las instrucciones siguientes:

Aspire de la forma mas completa posible el contenido de cada tubo.

Añada 3.0 mL de solución de lavado en cada tubo, espere 5 minutos y vacíelos de nuevo. Repita esta operación una vez más.

-Para obtener resultados fiables y reproducibles es necesario que las distintas etapas del lavado sean eficaces: es preciso que la eliminación de las distintas soluciones de incubación y de lavado sea la máxima posible.

-Mida la radioactividad restante en los tubos con un contador de centelleo gama.

**Nota: El tiempo de reacción así como el volumen requerido, dependerá del tipo de analito que se esté cuantificando.**

## **2. Ensayo Inmunoenzimático multiplicado**

### **Obtención y preparación de las muestras**

- Las muestras pueden recogerse en envases plásticos (es decir, polipropileno, policarbonato, polietileno) o de vidrio. Algunos plásticos absorben drogas.

### **Precauciones de empleo.**

-Nunca aspire las soluciones con la boca.

-No fume, coma ni beba en aquellas zonas donde se manipulen muestras o equipos.

-Utilice guantes desechables siempre que manipule muestras y lávese las manos cuidadosamente al terminar.

-Evite las salpicaduras. Descontamine y deseche las muestras y todos los materiales potencialmente contaminantes como si contuvieran agentes infecciosos.

#### Procedimiento.

-Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente.

-Ajuste el instrumento a 37°C.

-Reconstituya los controles, calibradores y reactivos de acuerdo con las instrucciones del fabricante, una vez reconstituidos, los reactivos son estables durante 12 semanas cuando se almacenan como se recomienda.

-Dispensar los controles, calibradores y muestras en los tubos de reacción,

-Seleccionar una  $\lambda$  de 340/380 nm.

-Dejar que la reacción se lleve a cabo, esto **no durara más de 30 minutos**.

-Esperar la lectura de cada una de las pruebas e interpretar de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

**Nota: El tiempo de reacción así como el volumen requerido, dependerá del tipo de analito que se esté cuantificando.**

### 3. Quimioluminiscencia

#### Precauciones de empleo.

-Nunca utilice la pipeta con la boca.

-No fume, coma ni beba en aquellas zonas donde se manipulen muestras o equipos.

-Utilice guantes desechables siempre que manipule muestras y lávese las manos cuidadosamente al terminar.

IV. TABLA 2. COMPARACION ENTRE RIA, EMIT Y QUIMIOLUMINISCENCIA (QL).

METODO	RIA	EMIT	QL
SENSIBILIDAD <sup>35</sup>	10 <sup>-18</sup> moles	10 <sup>-16</sup> moles	10 <sup>-19</sup> moles
ESPECIFICIDAD <sup>35</sup>	99.7%	99.5%	99.9%
MARCADOR PARA EL ANTIGENO	I <sup>125</sup>	6-fosfato deshidrogenasa	Luminol o Éster de acridina
TIEMPO DEL ANALISIS.	Hasta 3 horas.	1 hora máximo.	1 hora máximo
COSTO DEL ANALISIS	Elevado	Bajo	Medio
PERMISO SANITARIO	Si	No	No
DESECHOS RADIOACTIVOS	Si	No	No
ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS	Hasta 2 meses	3 meses	3 meses
VOLUMEN DE MUESTRA REQUERIDO	200 µL es suficiente	500 µL es suficiente	200 µL es suficiente
FACILIDAD DE LA TECNICA	Requiere varios pasos para llegar al resultado.	Rapida, no hay que dar tratamiento previo a la muestra	Rapida y no requiere pasos previos.

## V. DISCUSION DE RESULTADOS

El primer método abordado es Radioinmunoanálisis, este método es uno de los más sensibles y específicos pudiendo detectar concentraciones de drogas que van desde los nanogramos a picogramos. Una de sus mejores virtudes es que la determinación del analito se puede hacer aun cuando este se encuentre en una mezcla muy compleja, evitando la purificación previa de la muestra, con lo cual evita el gasto innecesario de otros reactivos, otra de sus características mas sobresalientes es que al hacer uso de un antígeno marcado con un radioisótopo, es fácil medir la cantidad de luz de decaimiento del mismo, con lo cual se puede cuantificar la concentración de la droga en la muestra con toda precisión, construyendo una curva de calibración e interpolando el valor obtenido al hacer la lectura de la muestra problema.

A pesar de lo comentado anteriormente y de los muchos años que la respaldan como una metodología extremadamente sensible y especifica para cuantificar drogas de abuso y muchas otras sustancias, su mayor desventaja es el uso de agentes radioactivos para el marcaje de los antígenos que sin duda son nocivos para la salud de los analistas, los cuales además tienen que ser altamente puros para que se cumpla con la especificidad requerida elevando demasiado su costo. Otra desventaja es que al tener que preparar una curva patrón, el resultado obtenido se ve fuertemente influenciado por la manipulación del operador, pudiendo tener excelentes o muy malos resultados, aunado a todo esto su metodología es muy tardada, pudiéndose llevar hasta tres horas para un solo resultado.

Con el paso de los años han aparecido algunas otras técnicas analíticas que nos permiten cuantificar drogas de abuso, como lo es el Inmunoensayo Enzimático Multiplicado (EMIT), que a diferencia del RIA utiliza una enzima para marcar el antígeno en lugar de un radioisótopo, con lo que indudablemente se disminuye la peligrosidad así como el costo. Una de las más sobresalientes ventajas de esta técnica es que al utilizar un sistema multiplicador de la actividad enzimática se aumenta en gran medida la sensibilidad de la técnica, además de que los

reactivos son más estables, fáciles de manipular y sin lugar a dudas su cuantificación es más sencilla al poder medir fácilmente la concentración por espectrofotometría.

Sin embargo, aun cuando es un método sensible, no llega a ser comparable con RIA ni con Quimioluminiscencia, y esto lo pone en desventaja frente a estas dos técnicas, ya que la actividad enzimática por desgracia se ve afectada por las sustancias contenidas en la matriz donde se encuentra el analito y difícilmente se puede restar esta interferencia y esto hay que tomarlo muy en cuenta al considerar los valores de corte para cada droga de abuso pues se podrían pasar por alto muestras positivas.

La aparición de la Quimioluminiscencia como técnica analítica para cuantificar drogas y otras sustancias, es sin duda un gran avance en este ámbito, esta técnica tiene grandes ventajas hasta el momento con respecto a las anteriores, su superioridad se debe a que tiene la misma o mejor sensibilidad y especificidad que el RIA y aun mas que el EMIT, no utiliza isotopos radioactivos lo que la hace sin duda muy segura.

Su sensibilidad esta dada por el tipo de reacción que se usa para formar la luz que se va a medir. Esta reacción es del tipo de oxido-reducción, la cual por sus características es fácil de producir y cuantificar, lo importante es que se cuente con un agente altamente oxidante como el  $H_2O_2$  el cual para obtenerlo no es caro y alguna sustancia capaz de oxidarse y emitir luz cuando esto suceda como el luminol.

Otra ventaja es el tiempo de reacción, ya que es muy corto en comparación con RIA, una prueba puede durar incluso minutos, los equipos no son difíciles de operar y los desechos originados no son altamente contaminantes.

La especificidad de los métodos descritos es similar, esto se debe a la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos exclusivamente al analito buscado o droga buscada, lo cual les da un sustento muy bueno en caso de que se cuestione algún resultado arrojado por cualquiera de estos métodos.

## VI. CONCLUSIONES

➤ Al analizar las ventajas y desventajas de los distintos métodos seleccionados para el estudio se determinó que la Quimioluminiscencia es un método que por:

- ✓ Su sensibilidad y especificidad arroja resultados equiparables con los de RIA.
- ✓ Su tiempo de reacción es mucho más rápido, incluso de minutos.
- ✓ Los reactivos utilizados son estables y no son tóxicos para el operador.
- ✓ El marcaje del anticuerpo se hace con sustancias que no necesitan fuente de excitación como el luminol, por lo que son baratos.

Es sin duda una de las mejores técnicas hasta el momento para determinar drogas de abuso, pero cabe señalar que la metodología más pertinente para los laboratorios que se dedican a realizar cuantificación de drogas son aquellas que se realizan con profesionalismo y responsabilidad.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Pascual S J R, Fernández R B. Consideraciones generales sobre drogas de abuso. Rev Medisan 2002; 6(4):58-71.
2. Gómez J, Pinillos M. A. Gainza I. Intoxicación por drogas. Rev. ANALES San Navarra 2003, Vol. 26, Suplemento 1.
3. Gisbert C J A, Medicina legal y toxicología. México, D.F.
4. Secretaría General de Sanidad, *Guía sobre drogas*, Ministerio de sanidad y consumo, Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas <<http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/publica/pdf/guiaDrogas.pdf>>.
5. Caro P. Drogas de Abuso. Guía teórico- práctico para su estudio. Ediciones la Rocca. 1996.
6. Páez Rodríguez J. Confirmación de drogas de abuso por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de muestras presuntamente positivas (tesis licenciatura), México; D.F.
7. Velapoldi R, Ph. D. And S. A. Wicks, M.S. The Use of Chemical Spot Tests Kits for the Presumptive Identification of Narcotics and Drugs of Abuse. Rev. J. of Foren. Scien., Vol. 19 No 8. January 1974.
8. Catherine A. Hammett-Stabler, Amadeo J. Donald J C. Urine drug screening in the medical setting, Rev Clin Chimica Acta. 125–135, 2002
9. Dreisbach R W. Manual de toxicología clínica. 6a ed. México D.F: Editorial Manual Moderno.
10. Castro A, Mittleman R. Determination of Drugs of Abuse in Body Fluids by Radioimmunoassay. Rev Clin Biochem. 11 (3) 103-105, 1978.

11. Laurent V, Lindberg I. Mini-RIA: adaptation of conventional I<sup>125</sup>-labeled radioimmunoassay to a 96-tube format, *Rev. Anal. Biochem.* (2002) 143–149.
12. Augsburger M., Rivier L., Mangin P. Comparison of different immunoassays and GC-MS screening of benzodiazepines in urine, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (1998) 681–687.
13. Knight B. *Medicina forense de Simpson*. 2a ed. México D.F: Editorial Manual Moderno, 1999.
14. Federal Register, “Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs”, Department of Health and Human Services. USA, 1994.
15. Klaassen C., Watkins J. *Manual de toxicología*. 5a ed. México D.F: Editorial Mc Graw-Hill, 2001.
16. Bannon P. EMIT Antiepileptic Drug Assays Adapted to an Abbott-VP Analyzer and Compared with a Gas-Chromatographic Procedure, *Rev Clin. Biochem* 15(4) 179-184 (1982).
17. Malkus H, Meola J M, Pippenger E. Evaluation of EMIT" Methods for the Determination of the Five Major Antiepileptic Drugs on an Automated Kinetic Analyser, *Clin. Biochem.* 11, (4) 139-142 (1978).
18. Engvall E. Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT, *Rev Methods in enzymology*, vol. 70.
19. Canavagh K, Driasey T F. Assessment of the EMIT T Technique as a Screening Test for Opiates and Methadone for a Methadone Maintenance

- Clinic and Its Calibration by Bayesian Statistics, *Clin. Biochem.* (5) 210-213 (1978).
20. Moore C, Negruzs A. Determination of drugs of abuse in meconium, *J. Chromatogr.*, 713 (1998) 137–146.
21. Legaz M, Vindmantas A. Correlation of the "Emit" Antiepileptic Drug Assay with a Gas Liquid Chromatographic Method. *Rev Clin. Biochem.* 9 (1) 35-38 (1976).
22. Wisdom B. Enzyme-Immunoassay, *Rev Clin. Chem.* 22/8, 1243-1255 (1976).
23. García. Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo. *Ars Pharmaceutica*, 2001.
24. Roda A, Paisini P, Mirasoli M, Michelini E. Bio- and chemiluminescence imaging in analytical chemistry, *Rev Anal. Chimica Acta* 541 (2005) 25–36.
25. Zhang Z, Zhang S. Recent developments and applications of chemiluminescence sensors, *Rev Anal. Chimica Acta* 541 (2005) 37–47.
26. J.T. Cody, "Specimen Adulteration in drug Urinalysis", *Forensic Sci. Rev.* 2:63, 1990.
27. Gracia G L, Campaña G M, Perez H J. Chemiluminescence detection in liquid chromatography: Applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis, *Rev Anal. Chimica Acta* 640 (2009) 7–28.
28. Ariniemi K, Portman M, Sihvonon M, Seppala T. Comprehensive Drug screening in blood for detecting abused drugs potentially hazardous for traffic safety. *J. Foren. Science International* 77 (1996).

29. Loomis T. Fundamentos de toxicología. Zaragoza: Editorial Acribia, 1996.
30. Montoya M. Toxicología clínica. 3e ed. México D.F: Méndez Editores, 2002.
31. Moreno R. Ensayos médico forenses y criminalísticas. México D.F: Editorial Porrúa, 1996.
32. Naha G. Manual de toxicomanías. Barcelona: Editorial Renaud Trouve, 1999.
33. Vargas E. Medicina legal. México D.F: Editorial Trillas, 1996.
34. Moore K A, Werner C, Zannelli R M, Levine B, Smith Michael L, PhD. Screening postmortem blood and tissues for nine cases of drugs of abuse using automated microplate immunoassay. J. Foren. Science International, 1999.
35. Armbruster D A, Schwarzhoff R, Pierce B L, Hubster E C. Method Comparison of EMIT 700 and EMIT II with RIA for Drug Screening, J. of Anal. Toxicology 18: 1994.
36. Waya B A, Waltonb K, Koenigb J, Eveland B, Scot M, Comparison between the CEDIA and EMIT II immunoassays for the determination of Benzodiazepines, Rev Clin. Chimica Acta 271 (1998) 1–9.
37. Francis P, Adcock J, Purcell S , Pfeffer M. Chemiluminescence detection of opium poppy (*Papaver somniferum*) alkaloids, Rev J. of Pharma. and Biom. Anal. 48 (2008) 508–518.