



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Propuesta de Manual de Laboratorio para la Asignatura de
Toxicología (Clave: 1485), de la Licenciatura en Ciencia Forense
de la Facultad de Medicina de la UNAM**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO**

**PRESENTA
JUAN PABLO CAPULTITLA REYES**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARÍA ELENA BRAVO GÓMEZ
VOCAL: Profesor: SITLALI DEL ROSARIO OLGUÍN REYES
SECRETARIO: Profesor: PAULINA DEL VALLE PÉREZ
1er. SUPLENTE: Profesor: SANDRA MARÍA CENTENO LLANOS
2° SUPLENTE: Profesor: ALEJANDRA QUIJANO MATEOS

**LABORATORIO DE DOCENCIA EN QUÍMICA, LICENCIATURA EN CIENCIA
FORENSE, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. MARÍA ELENA BRAVO GÓMEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

QFB. ALEJANDRA QUIJANO MATEOS

SUSTENTANTE (S):

JUAN PABLO CAPULTITLA REYES

Dedicatoria.

A MIS PADRES REMIGIO CAPULTITLA Y ANTONIA REYES QUE HAN CONFIADO EN MÍ DESDE EL INICIO DE MI FORMACIÓN ACADÉMICA ANTEPONIENDO MI BENEFICIO EN POS DE PERMITIRME CONSEGUIR MIS METAS.

A MIS HERMANAS JULIA, ANA, JUDITH Y FAMILIARES QUE HAN SIDO MI SOPORTE O TESTIGOS EN MI LUCHA POR CONSEGUIR ESTA META. JUAN CARLOS, ALBERTO, NATAN, MARIANO, ÁNGEL, LUIS ÁNGEL, JOSÉ LUIS, MIGUEL ÁNGEL, JORGE, VIRIDIANA, DANIEL.

A GUILLERMINA VELASCO POR CREER EN MÍ, POR IMPULSARME A SER MEJOR PERSONA EN TODOS LOS ASPECTO, POR ENSEÑARME A BUSCAR COSAS NUEVAS Y POR ENSEÑARME A DAR PASOS SEGUROS EN LAS DECISIONES DIFÍCILES DE ESTA ETAPA.

A MIS AMIGOS POR SER MIS CÓMPLICES, CONFIDENTES, COMPAÑEROS DE VIDA Y EJEMPLOS A SEGUIR, EN ESPECIAL A: NANCY ORTIZ, ISRAEL, XIOMARA, SERGIO, BRENDA JESSICA, THALÍA, GABRIELA MARGARITA, FABIOLA, LEOBARDO, MARCO LINARTE, SUELEN ISHEL, RAÚL, CHRISTIAN, CARLA, ERIKA, MARIO ERNESTO, HELEN JOCELYN, CLAUDIA, ANGÉLICA VELASCO, MAXIMILIANO, NANCY, ANGÉLICA, ENTRE OTROS.

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de prepararme académica e intelectualmente desde mi inicio en la Preparatoria No. 1 Gabino Barreda. Por permitirme ser parte del digno y orgulloso grupo de profesionistas pertenecientes a la máxima casa de estudios del país.

A la Facultad de Química de Ciudad Universitaria por su ardua y persistente labor para formar profesionistas de calidad con su destacado conjunto de profesores, instalaciones y equipamiento.

A la Dra. María Elena Bravo-Gómez por todo el conocimiento y experiencia transmitida desde mi llegada al grupo de trabajo. Por toda la confianza, comprensión, apoyo y orientación que recibí en cada avance en mi formación bajo su tutela.

A la QFB. Alejandra Quijano Mateos por su apoyo, colaboración y por sus conocimientos compartidos sin reservas con el proyecto y mi persona. Por su aportación crucial en la estructura del manual y su compromiso en la elaboración del mismo.

A mis padres, hermanas, a Guillermina Velasco, a mis familiares y a todos mis amigos que sin su apoyo este sueño no sería realidad, ni tampoco habría sido tan extraordinario.

Agradecimientos Financieros:

DGAPA, proyectos **PAPIME 2016 PE208016 Y PAPIIT 2016, TA200316.**

Contenido.

1. Introducción.....	9
1.1 Justificación.....	9
1.2 Objetivo.....	12
1.2.1 Objetivos particulares.....	12
2. Antecedentes.....	14
2.1. Modelos Didácticos Tradicionales.....	14
2.2. Modelos Didácticos Innovadores.....	16
2.3. Aprendizaje Basado en Competencias.....	18
2.4. Aprendizaje por Descubrimiento.....	19
2.5. Aprendizaje por Indagación.....	20
2.6. Aprendizaje por Investigación Dirigida.....	21
3. Metodología.....	28
3.1. Diseño de la Propuesta de Manual de Laboratorio para la Asignatura de Toxicología.....	29
4. Resultados.....	43
Manual Práctico para el aprendizaje de Toxicología Forense: Un Ejercicio de Investigación Dirigida.....	45
Contenido.....	49
Presentación.....	53
Introducción.....	53
Objetivos del Manual.....	57
Orientación del manual.....	59
Capítulo 1. Aspectos Generales de Laboratorio.....	61
Lineamientos Generales Para El Desarrollo De Actividades Experimentales En Los Laboratorios De Docencia De La Licenciatura En Ciencia Forense.....	61
Capítulo 2. Generalidades en el tratamiento de muestras.....	69
1. Selección de la Muestra.....	71
1.1. Muestreo Ante-Mórtem.....	74
1.2. Muestreo Post-Mórtem.....	92
Ejercicio Práctico 1.....	114
2. Recolección, embalaje, transporte y almacenamiento de muestras.....	115

2.1. Recolección ante-mórtem.....	116
2.2. Recolección post-mórtem.....	119
2.3. Embalaje de muestras.....	122
2.4. Traslado y almacenamiento de muestras.....	125
Ejercicio Práctico 2.....	128
3. Protocolos de actuación Forense.....	129
3.1. Cadena de Custodia.....	129
Ejercicio Práctico 3.....	135
Capítulo 3. Preparación de muestras.....	139
1. Sangre.....	141
2. Orina.....	147
3. Cabello y Uñas.....	150
4. Saliva (Fluido Oral; OF).....	155
5. Bilis.....	157
6. Contenido Gástrico.....	160
7. Hígado.....	161
Ejercicio Práctico 4.....	163
Capítulo 4. Pruebas de orientación o presuntivas.....	165
1. Cromatografía en capa fina (CCF por sus siglas en español o TLC en inglés).	167
2. Análisis Inmunológicos.....	170
2.1. Inmunoensayos enzimáticos (EIA, Enzyme Immunoassay).....	172
2.2. Multiensayo enzimático (EMIT, Enzyme Multiplied Immunoassay Technique).....	173
2.3. Inmunoensayo de donador enzimático clonado (CEDIA, Cloned Enzyme Donor Immunoassay).....	174
2.4. Inmunoensayos Enzimáticos ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay).....	175
3. Pruebas colorimétricas.....	177
3.1. Benedict.....	180
3.2. Bouchardat.....	181
3.3. Diazotación.....	181
3.4. Dicromato de Potasio.....	182

3.5. Difenilamina.	183
3.6. Ditionito de Sodio.	183
3.7. Dragendorff.	184
3.8. Folin–Ciocalteu.	184
3.9. Formaldehído-sulfúrico.	185
3.10. Forrest.	185
3.11. FPN (Cloruro de hierro III: ácido perclórico: ácido nítrico).	186
3.12. Fujiwara.	186
3.13. Yodoplatínico.	187
3.14. Koppanyi-Zwicker.	187
3.15. Liebermann.	188
3.16. Mandelin.	188
3.17. Marquis.	188
3.18. Nessler.	189
3.19. Ninhidrina.	190
3.20. o-cresol.	190
3.21. p-dimetilaminobenzaldehído (p-DMAB).	191
3.22. Parry-Koppanyi.	191
3.23. Permanganato de potasio.	192
3.24. Simon.	192
3.25. Tricloruro férrico.	193
3.26. Trinder.	193
3.27. Valser-Mayer.	194
3.28. Zwicker.	194
4. Espectroscopía Infrarroja.	195
5. Espectrofotometría UV-Visible.	198
Ejercicio Práctico 5.	200
Capítulo 5. Pruebas de Confirmación.	201
1. Métodos de Separación o Cromatográficos.	204
1.1. Cromatografía de Gases (GC).	204
1.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC O CLAR).	221
2. Métodos espectroscópicos.	228

2.1. Espectrometría de Masas (MS).....	231
2.2. Espectroscopía Atómica de Absorción (AAS).....	237
2.3. Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP).	244
Ejercicio Práctico 6.	254
Capítulo 6. Interpretación de Resultados Toxicológicos. Factores a considerar. ..	255
Ejercicio Práctico 7.	269
Presentación de Casos.....	273
Referencias Bibliográficas.....	276
Anexos.....	284
Anexo 1. Índice de figuras.....	284
Anexo 2. Índice de tablas.	286
Anexo 3. Reporte de seguridad e higiene.	288
Anexo 4. Procedimiento para el lavado de frascos de vidrio.....	294
Anexo 5. Hoja de seguridad de reactivos.	295
Anexo 6. Reporte de seguridad e higiene	296
Anexo 7. Rúbrica para evaluación de Dictamen.	297
Anexo 8. Rúbrica para evaluación de Bitácora de Laboratorio.....	305
Glosario.	310
5. Evidencia de Resultados.....	331
6. Conclusiones.....	345
7. Bibliografía.....	347

1. Introducción.

1.1 Justificación.

El reciente crecimiento de la Ciencia Forense dentro del contexto histórico-social, principalmente en lo concerniente a la aplicación de las diferentes disciplinas científico-técnicas como herramientas en la procuración y administración de la justicia, dio pie a que en septiembre de 2005 se iniciara el proceso de creación del plan de estudios de la Licenciatura en Ciencia Forense (LCF), proceso que culminó en enero de 2013 con su aprobación, recibiendo finalmente a la primera generación de estudiantes en agosto de 2013. Debido a la reciente creación de la Licenciatura dentro de la UNAM y a que el plan de estudios está diseñado con un modelo de Aprendizaje Basado en Competencias (ABC), el material didáctico y de consulta específico resulta de difícil acceso en algunas materias como toxicología, en la cual, los alumnos de la primer generación trabajaron en el semestre 2015-II sin un manual de laboratorio enfocado en la aplicación dentro del campo forense de esta disciplina que se desarrollara con un modelo de enseñanza-aprendizaje del tipo ABC. Esta falta de materiales didácticos elaborados con modelos educativos innovadores para la materia de toxicología con un enfoque forense ha destacado la necesidad de crear materiales de consulta y apoyo para la docencia de las ciencias con un enfoque fuera del ambiente clínico, dejando plausible la oportunidad de implementar y desarrollar materiales de fácil comprensión y acceso que le permita a los alumnos, que cuentan con una preparación multidisciplinaria, adquirir y desarrollar un pensamiento crítico que sea la base sólida de su actuar profesional dentro del campo de la Ciencia Forense.

De esta manera, la creación de compendios de información básica del área que estén actualizados, con respecto al contexto nacional e internacional, le brindará a los alumnos un panorama general de la utilidad que ofrece el uso de esta disciplina para la ciencia forense y les permitirá tener un referente de los procesos que se deben realizar en una investigación judicial con el objetivo de coadyuvar en el esclarecimiento de algún suceso en particular.

A diferencia de otros manuales de laboratorio basados en modelos clásicos de enseñanza de las ciencias que incluyen protocolos completos y estrictos en cuanto a los reactivos o los pasos a seguir para desarrollar cada una de las etapas de los análisis cualitativos y cuantitativos; el enfoque basado en el desarrollo de competencias incentiva a los alumnos a ser los protagonistas de su aprendizaje al mismo tiempo que los instruye en los métodos de búsqueda de información, protocolos o metodologías de análisis actualizados; información que deben aprender a seleccionar para posteriormente aplicar aquello que han comprendido por su ejercicio de Investigación Dirigida, obteniendo las bases necesarias de este manual de toxicología que les permitirá discernir entre los acervos de información consultados.

Como se mencionó antes, la Licenciatura en Ciencia Forense de la Facultad de Medicina de la UNAM ha contado desde su fundación con un programa de estudios enfocado en el aprendizaje con base en competencias, en el Cuadro 1 se muestran las que destacan para la materia de toxicología.

El contar con materiales didácticos de consulta apropiados ayudará a los estudiantes a cumplir con el perfil intermedio del profesionista en Ciencia Forense y les permitirá adquirir el logro de elementos como el conocimiento, habilidades, actitudes y valores necesarios para el cumplimiento de las competencias anteriores. De igual forma, al no contener una serie de protocolos pre-seleccionados para cada sesión de laboratorio y dado que se emplea un esquema ABC, el alumno tendrá la posibilidad de buscar métodos de análisis actuales para cada una de sus experiencias dentro del laboratorio, dando como resultado un material didáctico con la flexibilidad de inducir en los alumnos una búsqueda actualizada de técnicas empleadas en el área forense a nivel local y a nivel internacional.

Así pues, el esquema del manual fue construido de forma coherente con el plan de estudios de la licenciatura para su empleo en un modelo de aprendizaje basado en competencias, empleando para ello la estrategia de Investigación Dirigida de la cual se obtiene como resultado final un material didáctico que a lo largo de su desarrollo, como se puede observar en el índice, guiará a los alumnos

paso a paso en su maduración académica para que ellos puedan obtener del manual las bases que serán la clave principal en la creación de su conocimiento, es decir, los guiará paso a paso en su camino por alcanzar un aprendizaje significativo. Adicionalmente, el manual incluye en sus anexos, rúbricas para la evaluación del trabajo en el laboratorio (bitácora).

Cuadro 1. Competencias y subcompetencias para la materia de toxicología.

Competencia	Subcompetencias
Actuación con bases científicas y desarrollo del pensamiento crítico.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Desarrolla pensamiento crítico y utiliza información, análisis, comparación e inferencias, en diferentes tareas. ❖ Realiza análisis químicos cuantitativos y cualitativos de sustancias. ❖ Utiliza el razonamiento matemático para comprender la física y la química.
Capacidad de recabar el material sensible significativo.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Identifica las características del indicio y el material sensible significativo. ❖ Identifica los tipos de material sensible significativo de acuerdo con el escenario. ❖ Identifica la relación entre material sensible significativo, técnica de identificación y lugar de la investigación.
Elaboración de protocolos de análisis.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Utiliza información científica y técnica para sus estudios. Aplicará el método científico, utilizando la estadística y la información para elaborar sus hipótesis.
Procesamiento de los indicios.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Utiliza el conocimiento científico para apoyar los problemas forenses.
Verificación de la calidad de los peritajes.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Aplica sus conocimientos de deontología y bioética para la verificación de la investigación forense.
Integración de la información y emisión de dictámenes.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Aplica sus conocimientos de comunicación escrita, verbal y presentaciones digitalizadas. ❖ Aplica su conocimiento del idioma inglés en la comunicación escrita, verbal y presentaciones digitalizadas, si fuese el caso.
Trabajo en equipo y ejercicio del liderazgo.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Utiliza las oportunidades formativas de aprendizaje colaborativo que permitirán su desarrollo integral. ❖ Actualiza de manera continua sus conocimientos por medio de la información. ❖ Trabaja en equipo de manera colaborativa y multidisciplinaria.

1.2 Objetivo.

Diseñar y elaborar un manual práctico para la asignatura de Toxicología Forense de la Licenciatura en Ciencia Forense que guíe al estudiante a través de un compendio de la información más relevante e indispensable dentro de ésta área, que les permita aplicar esta información al abordar y resolver un ejercicio de investigación dirigida que promueva el aprendizaje y el desarrollo de las competencias planeadas para esta asignatura.

1.2.1 Objetivos particulares.

Como objetivos particulares, la elaboración del manual de laboratorio de toxicología busca:

- Elaborar el material didáctico que permita introducir a los alumnos en el área de la toxicología forense.
- Elaborar el material didáctico que proporcione la información relevante sobre:
 - Las matrices biológicas de mayor empleo.
 - La toma y conservación de muestras biológicas.
 - Los métodos de preparación de muestras biológicas.
 - Las pruebas presuntivas y confirmatorias del área.
 - Las consideraciones en la interpretación de los resultados de los análisis toxicológicos.
- Elaborar cuestionarios dirigidos con la finalidad de fomentar en los estudiantes la aplicación de la información que se les proporciona, la actuación con bases científicas y el desarrollo del pensamiento crítico.
- Crear rúbricas que permitan evaluar el trabajo del estudiante en la elaboración de su bitácora y dictamen.
- Promover en los alumnos la aplicación de los conocimientos previos sobre diversas estrategias, metodologías y técnicas analíticas empleadas para la

extracción, identificación, cuantificación e interpretación de diferentes xenobióticos de interés legal.

- Promover en los alumnos la elaboración de planes de análisis de muestras biológicas para el desarrollo de pruebas toxicológicas.

2. Antecedentes.

2.1. Modelos Didácticos Tradicionales.

A lo largo de la historia, la didáctica de las ciencias ha sido marcada y dominada por el desarrollo de modelos basados en métodos de enseñanza-aprendizaje que preponderan el avance científico-técnico por encima de las necesidades humanas. Se buscaba explicar y predecir los fenómenos que se presentan en la naturaleza a través de generalizaciones que eran libres del contexto, tiempo y espacio por medio de análisis de resultados mediante estadísticas en donde el contexto humano no tiene la mayor importancia, reduciendo el trabajo de la ciencia a la aplicación del método científico en donde se recogen datos, se observa el fenómeno, se analiza su fundamento, se experimenta según este análisis y finalmente se llega a conclusiones.

Estos modelos educativos, basados en la memoria, están acotados a los contenidos de los libros o a todo aquello que dice el profesor frente a los alumnos a manera de discurso como información incuestionable [1], generando que las clases teóricas estén separadas de los trabajos prácticos y sean tomados como instancias diferentes ya que, aunque los trabajos prácticos estén diseñados para reforzar los conocimientos teóricos, el tiempo que se le debe dedicar a la parte experimental, la complejidad de los procesos y la protección de los propios alumnos, no permite realizar todos los protocolos seleccionados porque el contenido teórico excede las horas didácticas dentro de un ambiente práctico [2].

Esta situación obliga a que los manuales y materiales didácticos de laboratorio sean guías parecidas a instructivos de uso en donde está plasmado totalmente el procedimiento a seguir por el estudiante, brindándole tanto las condiciones, como los reactivos y los cambios significativos que requieren ser observados para que la práctica experimental pueda ser desarrollada en el menor tiempo posible.

La replicación de prácticas a manera de instructivos le permite al estudiante aprender técnicas experimentales y de manipulación de material de laboratorio,

ambas fundamentales para un buen desempeño dentro del aspecto profesional, pero descuida la construcción del conocimiento significativo, por ejemplo, el motivo de dicho estudio, el objetivo, el contexto de la motivación, etc.; impidiendo que los alumnos logren relacionar el trabajo de laboratorio con los conceptos teóricos, llegando a una concepción de la “práctica”, como un protocolo inamovible y estricto que decae en el olvido de los contenidos principales [2].

Otro aspecto característico de los modelos tradicionales es la visión de la ciencia como exacta e infalible que presenta al método científico como etapas mecánicas que suponen siempre un tratamiento cuantitativo de control riguroso en el cual se rechaza la invención, la creatividad y **la duda sobre los resultados obtenidos**, para los cuales, se transmiten conocimientos ya elaborados sin mostrar los problemas que generaron su construcción, su evolución, sus dificultades, las limitaciones del conocimiento y la perspectiva abierta que hubo que sortear para llegar a las conclusiones finales. En esta concepción de método científico se plasma una visión sumamente elitista de poca accesibilidad en donde los científicos se ven como genios aislados que muestran una visión descontextualizada de su sociedad, con poco o nulo interés por el trabajo en colaboración y que se catalogan ajenos a la necesidad de tomar decisiones por encima de dilemas éticos o morales [2].

Así pues, en los modelos educativos tradicionales se presenta a la teoría como precedente a la práctica, la cual solamente sirve para constatar a la teoría y sin ella no puede haber una apropiación del conocimiento. Debido a esto, los alumnos esperan soluciones acabadas y verificadas a las cuestiones de sus protocolos experimentales y de no obtener los resultados esperados, justifican su labor con frases como: “no me dio el resultado”, “a mí no me salió bien la práctica”, “el protocolo está mal diseñado” e incluso y aún más preocupante, suelen decir: “¿Por qué a mí no me dio lo mismo que a mi compañero?”, es decir, en el modelo educativo tradicional, la práctica solamente busca comprobar algo que ya se sabe, que es sumamente conocido y que puede clasificarse como aceptado o no aceptado [2].

Dadas estas circunstancias, existen carencias educativas en estos modelos, mismas que pueden ser saldadas si la enseñanza tradicional comienza a familiarizarse con la idea de que la metodología científica, busca el mismo objetivo que el aprendizaje conceptual y no buscan objetivos autónomos e independientes [3]. Finalmente, dado que estos modelos se centran principalmente en el discurso del profesor quien es experto en su materia, se plantea el papel de los alumnos como **receptores pasivos del conocimiento**, quienes deben encargarse de **acumular, memorizar y reproducir** los conocimientos expuestos por el docente, mismos que suelen ser evaluados por exámenes, o en su caso, por reportes de prácticas o exposiciones repetitivas, en donde lo que se mide es la cantidad de información memorizada y no la cantidad de conocimiento adquirido o creado.

Así pues, los modelos educativos tradicionales dejan en claro que son necesarias nuevas propuestas educativas que enseñen a los estudiantes a aprender y por consiguiente que se generen materiales didácticos o guías de laboratorio que delimiten y acoten correctamente la intervención de los alumnos en su formación, poniéndolos en todo momento como partícipes activos en la construcción de su propio conocimiento, buscando de esta manera, nuevos modelos de estudio integrales, endógenos y sostenibles que se centren en el constante progreso y evolución de un sistema vivo que permita transferir valores como el trabajo en equipo, la solidaridad, el respeto y el sentido de la responsabilidad para mantener un nivel armónico satisfactorio en el proceso de enseñanza-aprendizaje de los alumnos en todos los niveles, principalmente a nivel media superior y superior.

2.2. Modelos Didácticos Innovadores.

En los años noventa se impulsó un cambio en el campo educativo y se comenzó a trabajar en la revalorización de lo humano haciendo necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que sean amplias, sistemáticas, flexibles y con

cultura humanista con la finalidad de superar la enseñanza tradicional para lograr una mejor construcción del conocimiento [4].

En las nuevas tendencias educativas se busca la construcción del conocimiento de forma que alimente la inteligencia en general para estimular la reflexión sobre el saber y la integración personal de los conocimientos que formen **personas críticas, responsables de su aprendizaje y de su actuación.**

Dadas estas características, los modelos deben diferenciar entre el trabajo científico y la actividad experimental. Mientras que la actividad experimental engloba el llevar a cabo una serie de protocolos, el trabajo científico abarca la parte experimental y además una serie de actividades como la búsqueda bibliográfica para evaluar diferentes hipótesis, el conocimiento de las teorías que la sustentan, el intercambio de ideas grupales, la sociabilización de los resultados, la aceptación de críticas, las confrontaciones y el inherente surgimiento de nuevas hipótesis o la comprobación negativa de las mismas.

En la docencia de las ciencias, la labor del profesor queda sujeta a la estimulación de los alumnos por contemplar sus ideas preexistentes y confrontarlas con las ideas de los demás compañeros para favorecer debates que los impulsen a reafirmar los conocimientos que les servirán como base en la creación de forma activa de nuevos conceptos tomando el rol principal de una investigación científica. Por esta razón, el profesor deja de ser el principal autor en el aula de clases o el laboratorio y se convierte en facilitador o guía del aprendizaje con el objetivo de lograr en los alumnos una construcción del conocimiento en lugar de una transmisión pasiva de conocimientos [2].

Actualmente las tendencias en los modelos didácticos deben tener en cuenta que la meta fundamental en la enseñanza de las ciencias es “**aprender a aprender**” [5], para ver a la educación como una vía para la construcción de profesionistas diversos, creativos y conscientes [6].

Esta visión educativa innovadora alienta la creación de materiales didácticos contextualizados que relacionen la vida diaria con la toma de decisiones que presenten estudiantes con participación reflexiva, informada y responsable en la solución de problemas sociales. De esta forma, las universidades deben desarrollar

las capacidades y competencias en los alumnos que les permitan incorporar a la investigación científica como una estrategia de enseñanza-aprendizaje que les brinde la oportunidad de resolver no sólo problemas de su actuar profesional, sino de forma general en la vida diaria [7].

Para alcanzar este objetivo, se han desarrollado modelos educativos innovadores en la enseñanza de las ciencias que contemplan alguna estrategia no convencional dentro de su estructura. Algunas de las estrategias empleadas son:

- Aprendizaje por descubrimiento.
- Aprendizaje por indagación.
- Aprendizaje por Investigación Dirigida.

Estas tendencias ofrecen la posibilidad de reforzar modelos educativos como el aprendizaje basado en competencias (revisar la sección 2.3 del presente trabajo), modelo en el que se sustenta el diseño del plan de estudios de la Licenciatura en Ciencia Forense de la Facultad de Medicina de la UNAM.

2.3. Aprendizaje Basado en Competencias.

El Aprendizaje Basado en Competencias (ABC) es un sistema de enseñanza-aprendizaje cuyo objetivo es capacitar a la persona sobre los conocimientos científico-técnicos para que cuenten con la capacidad de aplicarlos en contextos diversos o complejos, integrando estos conocimientos con sus propias actitudes y valores en un modo propio de actuar profesional y personalmente [8].

El ABC significa establecer las competencias genéricas, transversales (instrumentales, interpersonales y sistemáticas) y específicas (propias de cada profesión) que se consideran necesarias, las cuales buscarán conjuntamente el desarrollo progresivo de la autonomía de los estudiantes y su capacidad de aprender a aprender [8].

El modelo educativo del ABC es por tanto, un enfoque pedagógico innovador asumido colectivamente y basado en la vinculación e interrelación de las materias

que contribuyen específicamente, aportando conocimientos científicos o técnicos y desarrollando competencias genéricas o específicas, en el que el estudiante es el verdadero motor de su autoaprendizaje, por lo que necesita una dosis de motivación propia, control de su esfuerzo y el desarrollo de estrategias que le ayuden al aprendizaje y a la reflexión sobre su conocimiento. Por estos motivos, el ABC se convierte en un sistema de aprendizaje personal que combina teoría y práctica en donde existe una dedicación sistemática más constante con un mayor compromiso del estudiante para gestionar adecuadamente su tiempo, dando como resultado el enriquecimiento de las estrategias de aprendizaje, mayor seguimiento y tutoría de los estudiantes individual o grupalmente y toda una gama de técnicas de evaluación de los conocimientos adquiridos que se alejan de los sistemas tradicionales basados fundamentalmente en la memorización que permitía el estudio intensivo en momentos cercanos a la aplicación de exámenes [8].

El ABC, como todos los modelos educativos, requiere a su vez de una serie de estrategias que le permitan desarrollar en los alumnos las características deseadas con la finalidad de alcanzar objetivos específicos en su evolución.

Las estrategias mencionadas en la sección 2.2, buscan alcanzar la autonomía en el aprendizaje de los estudiantes que puedan trasladar a todos los aspectos de su vida y no sólo en el área de aplicación de su profesión.

2.4. Aprendizaje por Descubrimiento.

En este modelo de aprendizaje, el alumno adquiere el conocimiento *descubriendo* los principios de la ciencia por sí mismo [9] desarrollando habilidades como la observación, la elaboración de hipótesis, la problematización de situaciones, la clasificación, organización coherente, recolección de información, análisis de datos y la confrontación que le permite obtener conclusiones finales [10].

El principal objetivo de esta estrategia es que los alumnos experimenten por sí mismos las cosas y se creen un concepto propio fundado en sus experiencias, realidad y entorno [9].

Dentro de sus principales atractivos y por lo cual es una herramienta muy útil para el ABC, es que el aprendizaje significativo se logra con la actitud activa del alumno, la cual es dependiente de su maduración intelectual.

Una característica primordial de esta estrategia es que se logran excelentes resultados por medio del empleo de TIC's (Tecnologías de la Información y de la Comunicación), sin embargo, el resultado está sujeto al interés del alumno en el tema, de lo contrario, las mismas TIC's pueden significar una distracción en el alumno.

Por otro lado, una de las limitaciones de la estrategia es que este tipo de aprendizaje sólo se produce cuando el profesor le presenta **todas las herramientas necesarias** al alumno para que descubra por sí mismo lo que desea aprender [11].

2.5. Aprendizaje por Indagación.

El aprendizaje por indagación se enfoca en brindarle al estudiante la oportunidad de conocer cómo se encuentra la ciencia en la vida diaria utilizando las actividades cotidianas para el proceso de enseñanza-aprendizaje de la disciplina en la que se emplea.

Los temas con esta estrategia se desarrollan partiendo de ejemplos de la vida diaria, así la búsqueda de modelos y teorías, debe estar relacionada con los experimentos que se desarrollan y su entorno.

Con ella se busca principalmente la comprensión macro y micro del mundo que nos rodea de manera tal que se pueda explicar la estructura fundamental del contexto en el que se desarrolla el alumno.

De esta forma, esta estrategia requiere de una metodología que parte del mundo material circundante a través de preguntas y respuestas. Una vez dentro del

campo de la indagación científica, se podrá identificar suposiciones, emplear el razonamiento crítico, el razonamiento lógico y se podrá considerar explicaciones alternas, lo que le permite al estudiante valorar la curiosidad científica y la capacidad de análisis como fuente de aprendizaje para utilizar el entorno cotidiano como un elemento cercano a la didáctica de las ciencias que es el ambiente adecuado para propiciar el aprendizaje significativo[12].

2.6. Aprendizaje por Investigación Dirigida.

Esta estrategia sitúa al aprendizaje como un proceso de investigación que debe realizar el individuo que busca la comprensión de un fenómeno o suceso para entender e interpretar aquello que es de su interés a través del análisis de los datos con los que cuenta mediante un proceso de inducción analítica. Esto significa que en este método, el investigador involucra en el análisis sus propios antecedentes y experiencias que lo llevarán a tener una construcción de su conocimiento de manera activa.

En esta estrategia, similar a las dos anteriores, los profesores dejan de ser los actores principales de los modelos educativos y se convierten en guías de los estudiantes para motivarlos a desempeñar un “rol activo” que les permita ver a la investigación científica como parte de la vida cotidiana [13].

El empleo de este método para el aprendizaje de conceptos científicos se aleja de la memorización y cuando se aplica la investigación científica para aprender el concepto, se construye un conocimiento con un significado verdadero [14].

Gracias a lo anterior se comprende a la Investigación Dirigida, más que como un método de enseñanza-aprendizaje, como un **método de construcción de conceptos y conocimientos** que le brinda a los estudiantes las herramientas para madurar paulatinamente en su autonomía de aprendizaje, pensamiento crítico, capacidad de participar en tareas colectivas y en la capacidad de desarrollar un pensamiento estratégico, llegando de esta manera al objetivo principal de las

nuevas tendencias en la enseñanza de las ciencias el cual hay que recordar que es: “aprender a aprender” [4].

Este modelo ofrece la posibilidad de emplear cuestionamientos planteados como problemas que permiten diagnosticar ideas y construir nuevos conocimientos, adquirir nuevas habilidades cognitivas, promover actitudes positivas y al mismo tiempo, promover actitudes científicas [15]. Las situaciones problemáticas deben ser cerradas (convergentes), es decir, la respuesta debe ser única [4].

Enfrentar situaciones problemáticas y a su vez elaborar posibles soluciones, suministra al estudiante la oportunidad perfecta para poder alcanzar un aprendizaje profundo que exige el desarrollo de procesos de justificación personales y colectivos que son piezas fundamentales de estrategias científicas destacadas [16], además de crear un compromiso equitativo entre el docente y el alumno para que ambos logren una planificación cuidadosa dejando el tiempo requerido para pensar, argumentar y refutar los conceptos que vayan surgiendo del ejercicio de investigación, exigiendo en el docente, una postura diferente frente al objeto de enseñanza y los alumnos.

Algunas de las características que vuelven sumamente eficiente esta estrategia; y por lo cual ha sido seleccionada para el manual de laboratorio de toxicología, es que ofrece una gran utilidad para proyectos de investigación que disponen de 8 semanas para su desarrollo y conclusión, que es el tiempo asignado al curso de toxicología del plan de estudios de la Licenciatura en Ciencia Forense. Aunado al tiempo necesario para su implementación, ofrece la posibilidad de impulsar el desarrollo intelectual de los alumnos fuera del salón de clases gracias al empleo de una guía previamente asignada por el profesor que les ayudará a resolver el problema determinado. Esta guía le permite al estudiante identificar claramente los conceptos, procedimientos y variables que se encuentran involucradas en la resolución de la situación problemática [17]. En el presente trabajo, el manual de laboratorio de toxicología es la guía proporcionada por el profesor que el alumno debe seguir para avanzar en la resolución del problema.

Las guías proporcionadas deben contener actividades centradas en los estudiantes, para lograr potenciar el trabajo colectivo con un aprendizaje

cooperativo que ayuda a migrar de modelos educativos tradicionales en donde los estudiantes generalmente escuchan, repiten y memorizan, para llegar a un modelo donde predomina el debate, análisis, organización, evaluación y cooperación. El aprendizaje cooperativo promueve, entre otras cosas, un mayor rendimiento que el aprendizaje competitivo individualista [18].

Otra pieza fundamental de la Investigación Dirigida es la coherencia entre las herramientas de evaluación y la innovación en el método de enseñanza-aprendizaje. Cuando se limita la evaluación a una prueba final que suele ser un examen objetivo y sin ambigüedades ni pensamientos divergentes, se fomentan destrezas como la memoria, el saber aplicar algoritmos matemáticos, identificar estructuras similares de problemas antes resueltos, etc., lo que origina que sólo se estudie para aprobar los exámenes y la evaluación se vuelva la dueña de la enseñanza que no impulsa a los alumnos a aprender, sino sólo a repetir.

En el aprendizaje por Investigación Dirigida, la evaluación es un instrumento de orientación e impulso que sirve para reflexionar y recapitular sobre los problemas, la estrategia, el alcance y la firmeza del mismo avance. Para asegurar mejores resultados se recomienda evaluar a partir de un registro de revisiones periódicas, trabajos individuales, trabajos colectivos, reportes de prácticas y revisiones globales que estén relacionados con el diseño del desarrollo de la investigación y las actividades en clase o laboratorio [16]. Con este nuevo enfoque, la evaluación se realiza con el fin de corregir, clarificar y consolidar, no con el objetivo de separar una serie de temas [18].

Es por eso que para conseguir un buen funcionamiento del modelo, se necesita planear con antelación las estructuras de las guías que serán entregadas a los alumnos, principalmente si incluyen trabajos prácticos de laboratorio para que no sean simples repeticiones de manipulación de instrumental y protocolos antiguos, sino que estas guías favorezcan el planteamiento de hipótesis, el diseño de varias posibles soluciones, la inclusión de metodologías de análisis y sobre todo, que promuevan una contextualización de los resultados.

Dado que no existe ningún modelo infalible, es necesario revisar los planes y guías implementados con el fin de optimizar resultados, buscar nuevas actividades

problematizadas que favorezcan el acercamiento del estudiante a situaciones semejantes a las que se enfrentan los científicos, e inclusive, si es necesario, considerar una reestructuración completa del modelo, la guía o los problemas presentados [19].

En la actualidad, una de las características de los modelos innovadores en el área de docencia es la flexibilidad con la que los profesores pueden planificar y desarrollar sus didácticas de trabajo de forma tal que las actividades previstas se adapten a cambios estructurales y de contenido conforme avance la maduración intelectual y el crecimiento de las capacidades de generar un autoaprendizaje por parte de los estudiantes. El caso de la Investigación Dirigida no es la excepción, sin embargo, varios autores coinciden en una estructura básica para la implementación de actividades, temas, e inclusive de cursos completos por medio del empleo de esta estrategia. En la Ilustración 1 se observa la estructura básica de esta herramienta plasmada en cinco etapas fundamentales [3].

Esta secuencia general se empleará más adelante para la planeación del manual de laboratorio que servirá de guía para los estudiantes de la LCF en su proceso de resolución de problemas. Las cinco etapas atendidas por esta estrategia son [3]:

1. Planteamiento del problema o subproblema (convergente) que se necesita resolver. Incluye las actividades específicas para que los alumnos tomen conciencia de su interés y puedan apropiarse del mismo. **Las situaciones problemáticas deben estar basadas en el origen de los conocimientos que el estudiante necesita construir.**
2. Elección de la secuencia de los temas (subproblemas) que serán incluidos en el **índice como hilo conductor lógico o posible estrategia de solución** que permita el avance paulatino en la solución de cada subproblema y al mismo tiempo, del problema global. La secuencia debe estar ligada intencional y lógicamente con el problema inicial, de lo contrario, su inclusión sería un desperdicio de tiempo. Cada subproblema debe ser más concreto por lo cual es preferible que el índice no sea diseñado únicamente por un profesor, sino por un grupo de profesores que estén involucrados en la asignatura y que participen de forma activa frente al grupo en donde se aplicará la estrategia.

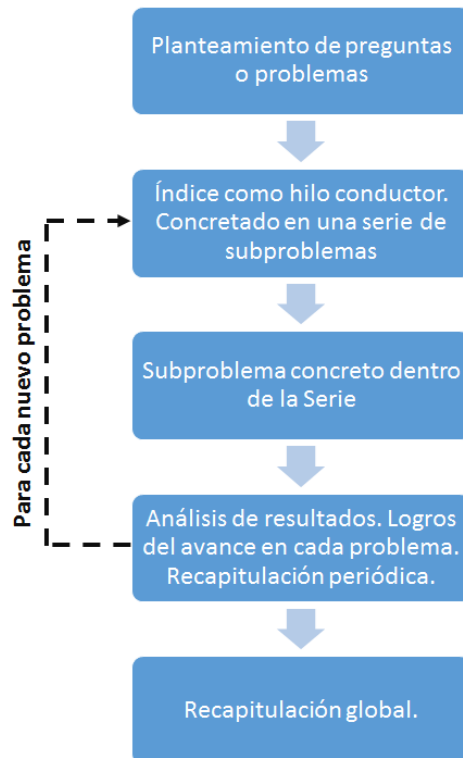


Ilustración 1. Secuencia de cinco pasos a seguir para la planeación de cursos temáticos [3] Modificado de la referencia.

3. **Desarrollar cada uno de los subproblemas** empleando los mismos cinco pasos generados en el problema global. Lo más importante de este punto es que la introducción de los nuevos conceptos debe ser propiciada por el profesor y los alumnos a manera de hipótesis, que deben ser probadas, condicionando su aceptación a que permitan avanzar en la solución del problema global.
4. Plantear una **evaluación periódica** que permita analizar los resultados obtenidos en cada subproblema. La recapitulación periódica permite hacer un balance entre los obstáculos superados y lo que falta por hacer para lograr solucionar el problema global. Este paso no puede ser omitido ya que le brinda al alumno una autorregulación y orientación que les impide perder los objetivos iniciales.
5. Generar una **recapitulación global** que inculque en los alumnos la integración de lo aprendido. La integración de todo aquello que realicen los alumnos les permitirá contextualizar el ejercicio de Investigación Dirigida para poder comunicar los resultados obtenidos, preferentemente considerando tanto la comunicación escrita como la oral. La comunicación escrita puede realizarse con un informe tipo artículo,

un dictamen o algún otro documento formal que sea empleado en el ambiente profesional al que se enfrentarán a futuro. La comunicación oral puede ser un ejercicio en donde exponga, sustente y defienda dicho informe escrito. El explicar todo el proceso de resolución de problemas exige en los alumnos la habilidad para crear y defender ideas propias frente a la confrontación con otros individuos que se desarrollan en el mismo ambiente de investigación. Los ejercicios de comunicación escrita y oral pueden convertirse también en instrumentos de evaluación.

De esta forma se crea una secuencia de subproblemas que estarán determinados por los conocimientos básicos que el alumno debe alcanzar al finalizar el curso, con la intención de aportar herramientas en el desarrollo de las competencias necesarias para la inclusión de los estudiantes en el área profesional. Las competencias mencionadas para la materia de Toxicología serán las responsables de la inclusión de los puntos contenidos en la presente propuesta de manual de laboratorio con la finalidad de incentivar la maduración académica en los alumnos.

Para el correcto planteamiento de problemas en la Investigación Dirigida, se debe partir de la premisa de que el problema surge de un hecho concreto que permitirá plantear la situación de forma clara, precisa y en términos que sea posible su solución, desarrollo, observación, medición y comprobación. De no plantear los problemas con estas características, la creación de hipótesis por parte de los alumnos será complicada, confusa o en ocasiones, poco útil. Cuando se diseña el planteamiento del problema y los subproblemas es indispensable recordar que las hipótesis son posibles soluciones o conjeturas que se formulan sobre el problema global y que tendrán que ser puestas a prueba de forma experimental, por lo cual, se deberán expresar claramente las actividades a desarrollar por los alumnos, mismas que deben estar enfocadas en los fundamentos de las hipótesis.

A manera de síntesis sobre lo que implica esta estrategia puede afirmarse que la Investigación Dirigida desarrolla en los estudiantes la capacidad de interpretar, analizar, sintetizar información y resolver problemas cruciales mediante la maduración en los alumnos de cualidades como el pensamiento crítico, la

observación, descripción y comparación, situando por consiguiente al modelo de docencia como una pieza fundamental para la investigación científica, para la formación de profesionistas que cumplan con las competencias necesarias en su actuar y sobre todo, para el desarrollo de un autoaprendizaje que le brinda a los estudiantes autonomía y maduración intelectual que los impulsen a modificar no sólo su propia realidad, sino también la del entorno social en el que se desenvuelven.

3. Metodología.

El diseño de la presente propuesta de manual de laboratorio se desarrolló con el empleo de la estrategia didáctica llamada Investigación Dirigida por ser una herramienta sumamente eficiente en la resolución de situaciones problemáticas planteadas a los alumnos en un tiempo de 8 semanas, de inicio a término, que es el periodo de duración de la asignatura de toxicología en el plan de estudios de la LCF y porque gracias a ella se logra promover el desarrollo de las competencias requeridas en los profesionistas de hoy en día dentro del área de la toxicología forense.

El ejercicio de Investigación Dirigida desarrollado por los alumnos, orientado hacia un aprendizaje de los conceptos básicos en toxicología a través de la resolución de un problema, fue diseñado por los profesores de la asignatura y el sustentante de la presente tesis. De forma paralela, se elaboraron las rúbricas de evaluación (para la bitácora y el dictamen) que fueron dadas a conocer a los estudiantes desde el inicio del curso de laboratorio para clarificar las características que debe reunir el actuar de los estudiantes en su desarrollo experimental, procurando de esta forma que los instrumentos de evaluación no sean los dominantes de la estrategia de enseñanza-aprendizaje seleccionada.

3.1. Diseño de la Propuesta de Manual de Laboratorio para la Asignatura de Toxicología.

Para el diseño del manual se empleó el esquema de cinco pasos mostrado en la sección anterior para realizar una planeación detallada sin dejar de ser concisa para su empleo dentro del laboratorio de Toxicología.

Como **primer etapa** se seleccionaron cuatro problemas globales que cuentan con las siguientes características:

- Situaciones cerradas o convergentes con sólo una solución posible: La única solución a la que debe llegar el alumno es a la identificación y cuantificación del xenobiótico específico de interés toxicológico planteado en las actividades de su problema, dicho de otra forma, el problema puede traducirse al planteamiento de la siguiente pregunta:

¿Se identifica la presencia de algún xenobiótico en la cantidad suficiente para generar el problema?

- Las actividades específicas que el alumno debe atender para la solución de esta pregunta serán determinadas en función del objetivo de cada problema:
 - Identificación inequívoca del xenobiótico.
 - Cuantificación del xenobiótico, si es que está presente, para determinarlo como agente causal.

En esta etapa también se determinaron los subproblemas que marcan los conocimientos necesarios involucrados en la resolución global del problema asignado en el laboratorio. Cada uno de los subproblemas fue tratado de forma individual e independiente para obtener los conceptos básicos que deben de conocer los alumnos de toxicología.

En la **segunda etapa** del diseño se elaboró el índice del manual para que su estructura sirva como guía en la resolución del problema. Se agruparon los temas seleccionados en capítulos que integran los subproblemas, los cuales cuentan con ejercicios en forma de cuestionarios que dirigen a los alumnos en su ejercicio de investigación para avanzar en la resolución del problema global.

En esta etapa se incluyó como primer capítulo a, los aspectos generales del laboratorio que incluyen los “Lineamientos de Laboratorio”, pues aunque no se menciona como una de las competencias dentro de la toxicología, el que el alumno conozca, domine y adquiera las habilidades y actitudes adecuadas para su desempeño dentro de cualquier laboratorio de experimentación, principalmente en aquellos en donde se manejan sustancias químicas y biológico-infecciosas, es una parte fundamental en su maduración hacia un actuar profesional.

Una vez diseñado el índice del manual, en la **tercera etapa** se desarrolló cada uno de los temas incluidos dentro de la serie para que el manual brinde la secuencia de pasos a seguir con los conceptos involucrados en el avance en la resolución del problema general.

Para lograr satisfactoriamente el desarrollo de esta etapa, se realizó una búsqueda bibliográfica con la finalidad de extraer la información relevante enfocada en el área de interés. Se revisaron fuentes clínicas y aplicadas al área forense de entidades nacionales e internacionales con el objetivo de plasmar información actualizada que permita a los estudiantes tener una visión amplia y general que les ayude a desarrollar un pensamiento crítico al momento de realizar su propia búsqueda bibliográfica.

En la **cuarta etapa**, teniendo desarrollados cada uno de los temas incluidos en el manual con los conceptos básicos del área, se diseñaron los ejercicios en forma de cuestionarios que fungen como guía para que los estudiantes puedan buscar los datos necesarios para la resolución del problema global. En estos cuestionarios se pide de forma explícita que los alumnos investiguen propiedades de las sustancias de interés, protocolos de análisis, etc., con el propósito que ellos

busquen y conozcan no sólo un protocolo con determinado objetivo, sino que sean capaces de discernir y elegir entre una variedad de ellos, en función de las necesidades de cada problema y los medios de los que disponen.

Gracias a la flexibilidad de la estrategia de Investigación Dirigida, se eligió que estos cuestionarios y su resolución fungieran tanto como guías en la maduración de los estudiantes, como recapitulaciones periódicas, ya que al concluir con cada uno de ellos se tiene una visión de los objetivos que se han alcanzado y de los conocimientos necesarios para poder continuar.

De la misma forma, se diseñó la rúbrica de evaluación de la bitácora puesto que además de ser una herramienta de evaluación, le permite al docente revisar el trabajo que han realizado los estudiantes de forma constante o periódica a través de cada semana. La bitácora en este punto deja de ser un cuaderno de notas y se observa como un registro, respaldo y como una herramienta que los alumnos deben aprender a desarrollar.

En la **quinta etapa** se diseñó la herramienta guía para la recapitulación global de los estudiantes que sirve también como una de las herramientas de evaluación. Esta guía indica a los alumnos los elementos necesarios con que debe contar el dictamen que deben elaborar como ejercicio de comunicación. La rúbrica del dictamen engloba en su estructura tanto los elementos formales con que cuenta un documento oficial, como los conceptos que deben argumentar los alumnos tras haber concluido con la resolución de su problema. El crear y defender argumentos mostrará la maduración que han alcanzado los estudiantes, así como la apropiación de información que han conseguido respecto al campo de aplicación forense de la toxicología.

En el Cuadro 2 se muestra el resultado del diseño de la propuesta de manual según el proceso de cinco etapas seguido para su realización.

Cuadro 2. Resumen del diseño de la propuesta de manual de laboratorio de toxicología para la LCF.

Capítulo del manual	Problema o Subproblemas	Conocimientos de origen (conceptos)	Desarrollo de los temas	Ejercicio de Investigación Dirigida	Competencia promovida
Presentación de Casos	<ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuál es el posible xenobiótico? • ¿Cómo relaciono al xenobiótico con los análisis toxicológicos? 	<ul style="list-style-type: none"> • Relacionar la información concreta del problema con las sustancias que se plantean en las solicitudes de intervención. • Naturaleza del xenobiótico. • Toxicocinética del xenobiótico. • Toxicodinamia del xenobiótico. • Propiedades fisicoquímicas del xenobiótico. • Metabolitos y sus propiedades. 	<ul style="list-style-type: none"> • Historia del caso. • Sintomatología y/o signos. • Posibles sustancias. • Solicitud de intervención (familia de xenobióticos). 	<p>Ejercicio práctico 1.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Relación entre las sustancias y los síntomas o signos. • Sustancia relacionada con el caso. 	<ul style="list-style-type: none"> • Actuación con bases científicas. • Pensamiento crítico. • Trabajo en equipo.

<p>Capítulo 1. Aspectos generales de laboratorio.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ¿Cómo comportarse dentro de un laboratorio? 	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de actividades dentro de un laboratorio 	<ul style="list-style-type: none"> • Lineamientos de Laboratorio. • Reglamento de Higiene y Seguridad. • Reglamento de Residuos. 	<p>Todas las sesiones de laboratorio.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rombo de comunicación de riesgos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Actitud profesional
	<p>1. Selección de la muestra:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Dónde encuentro al xenobiótico o sus metabolitos? • ¿Qué matriz(es) biológica(s) debo seleccionar para los análisis? 	<ul style="list-style-type: none"> • Posibles matrices biológicas. • Naturaleza de las matrices biológicas. • Propiedades de las matrices. • Composición de las matrices. • Función en el organismo. • Utilidad en la toxicología forense. • Información que puedo obtener de ella (xenobiótico, 	<p>Muestreo ante-mórtem</p> <ul style="list-style-type: none"> • Saliva. • Sangre. • Orina. • Cabello. <p>Muestreo post-mórtem</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sangre. • Orina. • Cabello. • Bilis. • Contenido gástrico. 	<p>Ejercicio práctico 1.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Propiedades fisicoquímicas de la sustancia. • Ruta de exposición. • Propiedades toxicocinéticas. • Propiedades toxicodinámicas. • Forma de detección. • Matrices de elección. 	

<p>Capítulo 2. Generalidades en el tratamiento de muestras.</p>		<p>metabolitos o ambos).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Toma de decisiones sobre las matrices de elección. • Argumentación de las elecciones. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hígado. • Uñas. • Otros. 		<ul style="list-style-type: none"> • Actuación con bases científicas. • Pensamiento crítico. • Trabajo en equipo y liderazgo.
	<p>2. Recolección, embalaje, transporte y almacenamiento de muestras.</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cómo puedo tomar una muestra de la matriz biológica? 	<ul style="list-style-type: none"> • Protocolos de toma de muestras. • Protocolos legales interpuestos. • Embalaje de muestra. • Traslado de muestra. • Almacenamiento de muestra. • Conservación de la muestra. 	<p>Recolección ante-mórtem.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sangre. • Orina. • Cabello. • Fluidos séricos. <p>Recolección post-mórtem.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sangre. • Orina. • Cabello y uñas. • Contenido gástrico. • Bilis. • Hígado y otros 	<p>Actividad demostrativa de la toma de muestras por parte del docente.</p> <p>Ejercicio práctico 2.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Características del recipiente primario. • Características del recipiente secundario • Características del embalaje. • Cuidados de transporte y almacenamiento 	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad de recabar material sensible significativo. • Procesamiento de muestras.

			<p>órganos.</p> <p>Embalaje de muestras.</p> <p>Traslado y almacenamiento de muestras.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Características de una bodega o almacén. 	
	<p>3. Protocolos de actuación forense.</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuáles son los protocolos de actuación forense relativos a la toma de muestras? 	<ul style="list-style-type: none"> • Cadena de custodia • Registro de cadena de custodia. 	<p>Cadena de Custodia.</p>	<p>Ejercicio práctico 3.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Características externas del embalaje. • Datos administrativos del RCC. • Precauciones para la manipulación de las muestras. • Aseguramiento de la integridad del RCC. • Precauciones en el 	

				RCC.	
Capítulo 3. Preparación de muestras.	<ul style="list-style-type: none"> ¿Cuál es el pretratamiento de las muestras obtenidas? 	<ul style="list-style-type: none"> Preparación de muestras (Pretratamiento). Homogeneización de muestras. Hidrólisis de muestras. Desproteínización de muestras. Extracciones (líquido-líquido; sólido-líquido; microextracción en fase sólida). 	Sangre. Orina. Cabello y uñas. Saliva. Bilis. Contenido gástrico. Hígado.	Ejercicio práctico 4. <ul style="list-style-type: none"> Protocolos para la preparación de muestras. Lista de material y reactivos. Seguridad e higiene de reactivos Preparación de soluciones Generación de residuos 	<ul style="list-style-type: none"> Elaboración de planes de análisis. Actuación con bases científicas. Pensamiento crítico. Trabajo en equipo. Liderazgo.
		<ul style="list-style-type: none"> Pruebas presuntivas. 	Cromatografía en capa fina.	Ejercicio práctico 5. <ul style="list-style-type: none"> Elección de pruebas presuntivas. Falsos positivos y 	<ul style="list-style-type: none"> Elaboración de planes de

<p>Capítulo 4. Pruebas de orientación o presuntivas</p>	<ul style="list-style-type: none"> ¿Cómo puedo delimitar mi plan de análisis para obtener resultados preliminares? 	<ul style="list-style-type: none"> Métodos de separación (Cromatografía en capa fina). Métodos inmunológicos. Pruebas colorimétricas. Métodos espectroscópicos (IR) Métodos espectrofotométricos (UV-Visible) 	<p>Análisis inmunológicos.</p> <p>Pruebas colorimétricas.</p> <p>Espectroscopía Infrarroja.</p> <p>Espectrofotometría de UV-visible</p>	<p>negativos de las pruebas seleccionadas.</p> <ul style="list-style-type: none"> Compatibilidad entre prueba presuntiva y pretratamiento realizado. Protocolos de pruebas presuntivas. Alcances de las pruebas seleccionadas. Preparación de soluciones. 	<p>análisis.</p> <ul style="list-style-type: none"> Actuación con bases científicas. Pensamiento crítico. Trabajo en equipo. Liderazgo.
<p>Capítulo 5. Pruebas de confirmación.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ¿Cómo puedo confirmar mis resultados preliminares? 	<ul style="list-style-type: none"> Pruebas confirmatorias. Métodos de separación. (Cromatografía de gases y cromatografía de líquidos). Métodos espectroscópicos (espectrometría de 	<p>Métodos de separación.</p> <ul style="list-style-type: none"> Cromatografía de gases. Cromatografía líquida de alta resolución. 	<p>Ejercicio práctico 6.</p> <ul style="list-style-type: none"> Selección de prueba de confirmación. Muestras medibles por estas técnicas. Alcances y limitaciones de las 	<ul style="list-style-type: none"> Elaboración de planes de análisis. Actuación con bases científicas.

	<ul style="list-style-type: none"> ¿Cómo puedo conocer la cantidad de la sustancia presente en mi muestra? 	<p>masas, espectroscopia de absorción atómica, espectroscopia de plasma con acoplamiento inductivo).</p> <ul style="list-style-type: none"> Acoplamiento entre técnicas. Cuantificación del xenobiótico. Métodos de cuantificación. Cuantificación por estándar externo. Cuantificación por estándar interno. Curvas de calibración. 	<p>Métodos espectroscópicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> Espectrometría de masas. Absorción atómica. Plasma de acoplamiento inductivo. 	<p>técnicas.</p> <ul style="list-style-type: none"> Técnica de elección para cada xenobiótico del problema. Proceso de Identificación. Proceso de cuantificación. Condiciones de trabajo. 	<ul style="list-style-type: none"> Pensamiento crítico. Trabajo en equipo. Liderazgo.
		<ul style="list-style-type: none"> Interpretación de resultados. Hallazgos (xenobiótico y/o metabolitos). Propiedades 		<ul style="list-style-type: none"> Historia del caso. Información del individuo. Aspectos en la toma de muestra. 	

<p>Capítulo 6. Interpretación de resultados toxicológicos . Factores a considerar.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ¿La cantidad de la sustancia identificada fue la causa del problema general? 	<p>toxicocinéticas y toxicodinámicas de las sustancias.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Matrices donde se encontraron los hallazgos. • Tiempo de vida media de las sustancias. • Concentraciones del xenobiótico y/o sus metabolitos. • Dosis tóxica media. • Dosis terapéutica. • Efectos toxicológicos relevantes. • Relación entre el xenobiótico y el metabolito: • [xenobiótico]/[metabolito] • Hallazgos en el lugar de la investigación. 	<p>Factores a considerar en la interpretación.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Hallazgos. • Xenobiótico o metabolitos • Propiedades fisicoquímicas • Propiedades toxicodinámicas • Propiedades toxicocinéticas • Matrices con resultados positivos (xenobiótico y/o metabolitos) • Relación: • Xenobiótico/metabolito • Relación entre resultados analíticos y temporalidad de exposición. • Relación entre cuantificación y 	<ul style="list-style-type: none"> • Integración de la información. • Actuación con bases científicas. • Pensamiento crítico. • Trabajo en equipo. • Liderazgo.
---	--	---	---	--	--

				posible agente causal <ul style="list-style-type: none"> Contextualización de resultados. 	
Rúbrica del dictamen.	<ul style="list-style-type: none"> ¿Cómo puedo comunicar y contextualizar la interpretación final de los datos, procesos y resultados analíticos? 	<ul style="list-style-type: none"> Elaboración de dictamen. Seminario oral de resultados. 	<ul style="list-style-type: none"> Puntos a considerar en la elaboración del dictamen 	<ul style="list-style-type: none"> Elaboración de dictamen. Ejercicio de seminario oral. 	<ul style="list-style-type: none"> Integración de información. Emisión de dictamen. Verificación de la calidad de los peritajes. Actuación con bases científicas. Pensamiento crítico. Trabajo en equipo y Liderazgo.
	<ul style="list-style-type: none"> ¿Cómo 				

<p>Rúbrica de la bitácora.</p>	<p>puedo tener un respaldo, evidencia, orden y control de mi trabajo?</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Elaboración constante de la bitácora de laboratorio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Puntos a considerar en la elaboración de la bitácora 	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de un trabajo responsable. 	<ul style="list-style-type: none"> • Actitud profesional
---------------------------------------	---	--	--	---	---

Para concluir esta sección en el Cuadro 3 se muestra una programación sugerida para la aplicación del manual, en un periodo de ocho semanas, según lo reportado por la estrategia de Investigación Dirigida.

Cuadro 3. Calendarización sugerida para la aplicación del manual.

Semana	Actividad para el alumno	Sección(es) del manual.
1	<ol style="list-style-type: none"> 1. Presentación del curso y evaluación. (Mapa conceptual de la toxicología: relación con otras áreas de la LCF y las competencias relacionadas con Toxicología) 2. Lineamientos de laboratorio. 3. Asignación de caso. 	<ul style="list-style-type: none"> • Capítulo 1. • Presentación de casos. • Anexo 7. • Anexo 8.
2	<ol style="list-style-type: none"> 1. Presentación de su plan de análisis global. (Modificable en función del avancen en la resolución del problema). 2. Actividad demostrativa de toma de muestras ante-mortem (no invasiva) por parte del docente. 3. Recepción de muestras. 4. Pretratamiento de muestras 1. (Dependiendo del avance). 5. Revisión de bitácoras. 	<ul style="list-style-type: none"> • Capítulo 2. • Capítulo 3. • Anexo 8.
3	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pretratamiento de muestras 1 o 2. (Dependiendo del avance) 2. Revisión de bitácora. 	<ul style="list-style-type: none"> • Capítulo 3. • Anexo 8.
4	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pretratamiento de muestras 2 o 3. (Dependiendo del avance) 2. Pruebas presuntivas 1. 3. Revisión de bitácora. 	<ul style="list-style-type: none"> • Capítulo 3. • Capítulo 4. • Anexo 8.
5	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pruebas presuntivas 2. 2. Pruebas de confirmación 1. (Dependiendo del avance). 3. Revisión de bitácora. 	<ul style="list-style-type: none"> • Capítulo 4. • Capítulo 5. • Anexo 8.
6	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pruebas de confirmación 2. (Dependiendo del avance). 2. Revisión de bitácora. 	<ul style="list-style-type: none"> • Capítulo 5. • Anexo 8.
7	<ol style="list-style-type: none"> 1. Recepción de resultados de pruebas de confirmación. 2. Interpretación de resultados. 3. Revisión de bitácora. 	<ul style="list-style-type: none"> • Capítulo 6. • Anexo 8.
8	<ol style="list-style-type: none"> 1. Entrega de dictamen. 2. Seminario oral de resultados. 3. Revisión de bitácora. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anexo 7. • Anexo 8.

4. Resultados.

A continuación se presenta el resultado obtenido en la “Propuesta de Manual de Laboratorio para la Asignatura de Toxicología (Clave: 1485), de la Licenciatura en Ciencia Forense de la Facultad de Medicina de la UNAM”.

La introducción del manual, así como los objetivos planteados que se reportan, están basados en los que se plasman en la presente tesis con la intención de brindarle a los usuarios un panorama general de su creación y las motivaciones que llevaron a los autores a diseñar un material didáctico con un modelo educativo innovador a través del empleo de la estrategia de Investigación Dirigida.

En la orientación del manual se describe de manera sencilla la estrategia de enseñanza-aprendizaje, usando como base la sección 2.6 de la presente tesis, con la finalidad de que los docentes que empleen este material, fundamenten la planeación de su curso de laboratorio con las directrices de la Investigación Dirigida y sepan guiar a los alumnos a lo largo de su proceso de maduración intelectual y personal en la materia.

Es preciso señalar que la numeración de las tablas y figuras dentro del manual es independiente a la reportada en las secciones 1, 2, 3, 5 y 6 del contenido de la tesis dado que se plantea el manual como un producto de contenido independiente.

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina

**Manual Práctico para el aprendizaje de Toxicología
Forense: Un Ejercicio de Investigación Dirigida.**
Laboratorio de Toxicología Clave 1485
Licenciatura en Ciencia Forense

María Elena Bravo Gómez
Juan Pablo Capultitla Reyes
Isidro Hinojosa López
Alejandra Quijano Mateos



Facultad de Medicina



Primera edición: 2016.

D. R. © 2016. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.
Facultad de Medicina, UNAM.

Prohibida la reproducción parcial o total por cualquier medio sin autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.

Impreso y hecho en México.

*“Todas las sustancias son venenos;
no hay ninguna que no lo sea.
La dosis es lo que determina que una
sustancia sea un remedio o un veneno”
(Paracelso)*

Contenido

Presentación.....	53
Introducción.....	53
Objetivos del Manual.....	57
Orientación del manual.....	59
Capítulo 1. Aspectos Generales de Laboratorio.....	61
Lineamientos Generales Para El Desarrollo De Actividades Experimentales En Los Laboratorios De Docencia De La Licenciatura En Ciencia Forense.....	61
Capítulo 2. Generalidades en el tratamiento de muestras.....	69
1. Selección de la Muestra.....	71
1.1. Muestreo Ante-Mórtem.....	74
1.2. Muestreo Post-Mórtem.....	92
Ejercicio Práctico 1.....	114
2. Recolección, embalaje, transporte y almacenamiento de muestras.....	115
2.1. Recolección ante-mórtem.....	116
2.2. Recolección post-mórtem.....	119
2.3. Embalaje de muestras.....	122
2.4. Traslado y almacenamiento de muestras.....	125
Ejercicio Práctico 2.....	128
3. Protocolos de actuación Forense.....	129
3.1. Cadena de Custodia.....	129
Ejercicio Práctico 3.....	135
Capítulo 3. Preparación de muestras.....	139
1. Sangre.....	141
2. Orina.....	147
3. Cabello y Uñas.....	150
4. Saliva (Fluido Oral; OF).....	155
5. Bilis.....	157
6. Contenido Gástrico.....	160
7. Hígado.....	161
Ejercicio Práctico 4.....	163

Capítulo 4. Pruebas de orientación o presuntivas.....	165
1. Cromatografía en capa fina (CCF por sus siglas en español o TLC en inglés).	167
2. Análisis Inmunológicos.....	170
2.1. Inmunoensayos enzimáticos (EIA, Enzyme Immunoassay).....	172
2.2. Multiensayo enzimático (EMIT, Enzyme Multiplied Immunoassay Technique).....	173
2.3. Inmunoensayo de donador enzimático clonado (CEDIA, Cloned Enzyme Donor Immunoassay).....	174
2.4. Inmunoensayos Enzimáticos ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay).....	175
3. Pruebas colorimétricas.....	177
3.1. Benedict.....	180
3.2. Bouchardat.....	181
3.3. Diazotación.....	181
3.4. Dicromato de Potasio.....	182
3.5. Difenilamina.....	183
3.6. Ditionito de Sodio.....	183
3.7. Dragendorff.....	184
3.8. Folin–Ciocalteu.....	184
3.9. Formaldehído-sulfúrico.....	185
3.10. Forrest.....	185
3.11. FPN (Cloruro de hierro III: ácido perclórico: ácido nítrico).....	186
3.12. Fujiwara.....	186
3.13. Yodoplatínico.....	187
3.14. Koppányi-Zwicker.....	187
3.15. Liebermann.....	188
3.16. Mandelin.....	188
3.17. Marquis.....	188
3.18. Nessler.....	189
3.19. Ninhidrina.....	190
3.20. o-cresol.....	190
3.21. p-dimetilaminobenzaldehído (p-DMAB).....	191

3.22. Parry-Koppanyi.	191
3.23. Permanganato de potasio.	192
3.24. Simon.	192
3.25. Tricloruro férrico.	193
3.26. Trinder.	193
3.27. Valsler-Mayer.	194
3.28. Zwikker.	194
4. Espectroscopía Infrarroja.	195
5. Espectrofotometría UV-Visible.	198
Ejercicio Práctico 5.	200
Capítulo 5. Pruebas de Confirmación.	201
1. Métodos de Separación o Cromatográficos.	204
1.1. Cromatografía de Gases (GC).	204
1.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC O CLAR).	221
2. Métodos espectroscópicos.	228
2.1. Espectrometría de Masas (MS).	231
2.2. Espectroscopía Atómica de Absorción (AAS).	237
2.3. Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP).	244
Ejercicio Práctico 6.	254
Capítulo 6. Interpretación de Resultados Toxicológicos. Factores a considerar. ...	255
Ejercicio Práctico 7.	269
Presentación de Casos.	273
Referencias Bibliográficas.	276
Anexos.	284
Anexo 1. Índice de figuras.	284
Anexo 2. Índice de tablas.	286
Anexo 3. Reporte de seguridad e higiene.	288
Anexo 4. Procedimiento para el lavado de frascos de vidrio.	294
Anexo 5. Hoja de seguridad de reactivos.	295
Anexo 6. Reporte de seguridad e higiene.	296
Anexo 7. Rúbrica para evaluación de Dictamen.	297
Anexo 8. Rúbrica para evaluación de Bitácora de Laboratorio.	305

Glosario	310
5. Evidencia de Resultados.....	331
6. Conclusiones.....	345
7. Bibliografía.....	347

Presentación

Introducción.

El reciente crecimiento de la Ciencia Forense dentro del contexto histórico-social, principalmente en lo concerniente a la aplicación de las diferentes disciplinas científico-técnicas como herramientas en la procuración y administración de la justicia, dio pie a que en septiembre de 2005 se iniciara el proceso de creación del plan de estudios de la Licenciatura en Ciencia Forense (LCF), proceso que culminó en enero de 2013 con su aprobación, recibiendo finalmente a la primera generación de estudiantes en agosto de 2013. Debido a la reciente creación de la Licenciatura dentro de la UNAM y a que el plan de estudios está diseñado con un modelo de Aprendizaje Basado en Competencias (ABC), el material didáctico y de consulta específico resulta de difícil acceso en algunas materias como toxicología, en la cual, los alumnos de la primer generación trabajaron en el semestre 2015-II sin un manual de laboratorio enfocado en la aplicación dentro del campo forense de esta disciplina que se desarrollara con un modelo de enseñanza-aprendizaje del tipo ABC. Esta falta de materiales didácticos elaborados con modelos educativos innovadores para la materia de toxicología con un enfoque forense ha destacado la necesidad de crear materiales de consulta y apoyo para la docencia de las ciencias con un enfoque fuera del ambiente clínico, dejando plausible la oportunidad de implementar y desarrollar materiales de fácil comprensión y acceso que le permita a los alumnos, que cuentan con una preparación multidisciplinaria, adquirir y desarrollar un pensamiento crítico que sea la base sólida de su actuar profesional dentro del campo de la Ciencia Forense.

De esta manera, la creación de compendios de información básica del área que estén actualizados, con respecto al contexto nacional e internacional, le brindará a los alumnos un panorama general de la utilidad que ofrece el uso de esta disciplina para la ciencia forense y les permitirá tener un referente de los procesos que se deben realizar en una investigación judicial con el objetivo de coadyuvar en el esclarecimiento de algún suceso en particular.

A diferencia de otros manuales de laboratorio basados en modelos clásicos de enseñanza de las ciencias que incluyen protocolos completos y estrictos en cuanto a los reactivos o los pasos a seguir para desarrollar cada una de las etapas de los análisis cualitativos y cuantitativos; el enfoque basado en el desarrollo de competencias incentiva a los alumnos a ser los protagonistas de su aprendizaje al mismo tiempo que los instruye en los métodos de búsqueda de información, protocolos o metodologías de análisis actualizados; información que deben aprender a seleccionar para posteriormente aplicar aquello que han comprendido por su ejercicio de Investigación Dirigida, obteniendo las bases necesarias de este manual de toxicología que les permitirá discernir entre los acervos de información consultados.

Como se mencionó antes, la Licenciatura en Ciencia Forense de la Facultad de Medicina de la UNAM ha contado desde su fundación con un programa de estudios enfocado en el aprendizaje con base en competencias, en la Tabla 1 se muestran las que destacan para la materia de toxicología.

El contar con materiales didácticos de consulta apropiados ayudará a los estudiantes a cumplir con el perfil intermedio del profesionista en Ciencia Forense y les permitirá adquirir el logro de elementos como el conocimiento, habilidades, actitudes y valores necesarios para el cumplimiento de las competencias anteriores. De igual forma, al no contener una serie de protocolos pre-seleccionados para cada sesión de laboratorio y dado que se emplea un esquema ABC, el alumno tendrá la posibilidad de buscar métodos de análisis actuales para cada una de sus experiencias dentro del laboratorio, dando como resultado un material didáctico con la flexibilidad de inducir en los alumnos una búsqueda actualizada de técnicas empleadas en el área forense a nivel local y a nivel internacional.

Así pues, el esquema del manual fue construido de forma coherente con el plan de estudios de la licenciatura para su empleo en un modelo de aprendizaje basado en competencias, empleando para ello la estrategia de Investigación Dirigida de la cual se obtiene como resultado final un material didáctico que a lo largo de su desarrollo, como se puede observar en el índice, guiará a los alumnos

paso a paso en su maduración académica para que ellos puedan obtener del manual las bases que serán la clave principal en la creación de su conocimiento, es decir, los guiará paso a paso en su camino por alcanzar un aprendizaje significativo. Adicionalmente, el manual incluye en sus anexos, rúbricas para la evaluación del trabajo en el laboratorio (bitácora).

Tabla 1. Competencias y subcompetencias para la materia de toxicología.

Competencia	Subcompetencias
Actuación con bases científicas y desarrollo del pensamiento crítico.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Desarrolla pensamiento crítico y utiliza información, análisis, comparación e inferencias, en diferentes tareas. ❖ Realiza análisis químicos cuantitativos y cualitativos de sustancias. ❖ Utiliza el razonamiento matemático para comprender la física y la química.
Capacidad de recabar el material sensible significativo.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Identifica las características del indicio y el material sensible significativo. ❖ Identifica los tipos de material sensible significativo de acuerdo con el escenario. ❖ Identifica la relación entre material sensible significativo, técnica de identificación y lugar de la investigación.
Elaboración de protocolos de análisis.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Utiliza información científica y técnica para sus estudios. Aplicará el método científico, utilizando la estadística y la información para elaborar sus hipótesis.
Procesamiento de los indicios.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Utiliza el conocimiento científico para apoyar los problemas forenses.
Verificación de la calidad de los peritajes.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Aplica sus conocimientos de deontología y bioética para la verificación de la investigación forense.
Integración de la información y emisión de dictámenes.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Aplica sus conocimientos de comunicación escrita, verbal y presentaciones digitalizadas. ❖ Aplica su conocimiento del idioma inglés en la comunicación escrita, verbal y presentaciones digitalizadas, si fuese el caso.
Trabajo en equipo y ejercicio del liderazgo.	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Utiliza las oportunidades formativas de aprendizaje colaborativo que permitirán su desarrollo integral. ❖ Actualiza de manera continua sus conocimientos por medio de la información. ❖ Trabaja en equipo de manera colaborativa y multidisciplinaria.

Objetivos del Manual.

Poner a disposición de los alumnos y profesionistas interesados en el área de aplicación forense de la toxicología, un compendio de la información más relevante e indispensable acompañada de una serie de casos problema que promueven el aprendizaje basado en problemas y el desarrollo de las competencias necesarias para esta área de aplicación.

Objetivos particulares.

Como objetivos particulares, el manual de laboratorio de toxicología busca:

- Proporcionar material didáctico que permita introducir a los alumnos en el área de la toxicología forense a través de ejercicios de Investigación Dirigida.
- Proporcionar información relevante sobre:
 - Las matrices biológicas de mayor empleo.
 - La toma y conservación de la muestra hasta su análisis.
 - Los métodos de extracción y preparación de muestras biológicas.
 - Las pruebas presuntivas y confirmatorias del área.
 - Las consideraciones en la interpretación de los resultados de los análisis toxicológicos.
- Elaborar cuestionarios dirigidos con la finalidad de fomentar en los estudiantes la aplicación de la información que se les proporciona, la actuación con bases científicas y el desarrollo del pensamiento crítico.
- Proporcionar rúbricas modelo que permitan evaluar el trabajo del estudiante durante su ejercicio de Investigación Dirigida en la elaboración de su bitácora y dictamen.
- Promover en los alumnos la aplicación de los conocimientos previos sobre diversas estrategias, metodologías y técnicas analíticas empleadas para la

extracción, identificación, cuantificación e interpretación de diferentes xenobióticos de interés legal.

- Promover en los alumnos la elaboración de planes de análisis de muestras biológicas para el desarrollo de pruebas toxicológicas.

Orientación del manual.

El presente manual de laboratorio está diseñado para contar con una orientación que permita el aprendizaje basado en competencias gracias al empleo de la estrategia didáctica de **Investigación Dirigida**.

En la Investigación Dirigida, los profesores pasan de ser los actores principales de los modelos educativos, a ser guías de los estudiantes quienes se encargarán de seguir las directrices del docente quien acotará su avance en la construcción o modificación de nuevos conceptos, lo que inducirá en los alumnos el desarrollo cognitivo.

El empleo de este método para el aprendizaje de conceptos científicos se aleja de la memorización y cuando se aplica la investigación científica para aprender el concepto, se construye un conocimiento con un significado verdadero.

Gracias a lo anterior, el manual le brinda a los estudiantes las herramientas para madurar paulatinamente en su autonomía de aprendizaje, pensamiento crítico, capacidad de participar en tareas colectivas y en la capacidad de desarrollar un pensamiento estratégico, llegando de esta manera al objetivo principal de las nuevas tendencias en la enseñanza de las ciencias “aprender a aprender” [1].

Este modelo permite que quien lo emplee, use cuestionamientos planteados como problemas o casos, distintos a los incluidos en este manual, para generar una situación incierta que permitan diagnosticar ideas y construir nuevos conocimientos, adquirir nuevas habilidades cognitivas, promover actitudes positivas y al mismo tiempo, promover actitudes científicas.

Esta estrategia; ofrece una gran utilidad para proyectos de investigación que disponen de 8 semanas para su desarrollo y conclusión. El manual de laboratorio de toxicología funge como guía proporcionada por el profesor, que el alumno debe seguir para avanzar en la resolución del problema asignado.

Gracias a que las actividades están centradas en los estudiantes, permite potenciar el trabajo colectivo con un aprendizaje colectivo, para obtener dinámicas

donde predomina el debate, análisis, organización, evaluación y cooperación en vez de la memorización.

A manera de síntesis el manual pretende desarrollar en los estudiantes, la capacidad de interpretar, analizar, sintetizar información, buscar y resolver problemas cruciales mediante la maduración en los alumnos de cualidades como el pensamiento crítico, la observación, descripción y comparación. Favoreciendo de esta forma la formación de profesionistas que cumplan con las competencias necesarias en su actuar y sobre todo, para el desarrollo de un autoaprendizaje que le brinda a los estudiantes autonomía y maduración intelectual que los impulsen a modificar no sólo su propia realidad, sino también la del entorno social en el que se desenvuelven.

María Elena Bravo-Gómez
Juan Pablo Capultitla Reyes
Isidro Hinojosa López
Alejandra Quijano Mateo

Capítulo 1. Aspectos Generales de Laboratorio.

Lineamientos Generales Para El Desarrollo De Actividades Experimentales En Los Laboratorios De Docencia De La Licenciatura En Ciencia Forense

1. De la observación de reglamentos y garantía de seguridad

- 1.1. Es responsabilidad del Profesor asegurar el cumplimiento de los reglamentos aplicables al laboratorio y comunicar cualquier irregularidad al Responsable del mismo.
- 1.2. Cada laboratorio cuenta con una bitácora en la que se debe registrar la actividad o práctica realizada, incluyendo el título y una breve descripción de la misma, así como cualquier otro comentario que se considere pertinente; arreglos, ensayos previos, toma de datos, etc.
- 1.3. Los reglamentos se darán a conocer a todos los alumnos y profesores al inicio del semestre lectivo y se recabarán firmas de enterado en la lista localizada en el syllabus del Profesor de la asignatura.
- 1.4. Para trabajar en los laboratorios es obligatorio el uso de equipo de protección (alumnos y profesores); bata (cerrada) y en caso de ser necesario, lentes de seguridad, guantes y cubrebocas; es responsabilidad del usuario contar con el equipo mencionado, de otra forma no se podrá ingresar al laboratorio. El uso de equipo de protección será aplicable también para cualquier persona que no realice prácticas en el laboratorio pero que permanezca en el mismo. Queda prohibido el uso de lentes de contacto, cabello suelto y zapatos abiertos en caso de que la asignatura así lo requiera.
- 1.5. Los alumnos NO podrán realizar actividades en el laboratorio ni permanecer en el mismo, dentro o fuera de su horario de clase SIN la presencia de al menos un Profesor. Los Profesores serán los primeros en ingresar y los últimos en salir de los laboratorios.

1.6. Está estrictamente prohibido consumir alimentos o bebidas dentro de los laboratorios.

1.7. Los Profesores o Responsables de la asignatura, en caso de requerirlo tendrán acceso a las fichas de información médica actualizada de los alumnos a través de la Unidad de Docencia.

2. De la programación de actividades

2.1. Son responsabilidades del Profesor

2.1.1. Solicitar a los Responsables de los laboratorios, un semestre previo a la impartición de la asignatura, los insumos y materiales a utilizar durante el semestre. Se les notificará con antelación para llenar los formatos correspondientes, los cuales deberán llenarse electrónicamente e incluir la descripción completa del insumo y sugerencia de proveedor con número de catálogo. **No se realizarán compras extemporáneas ni de solicitudes incompletas.**

2.1.2. Entregar a la Unidad de Docencia y al Responsable del laboratorio donde se imparte su asignatura, la calendarización de las sesiones prácticas a realizar. Esperar de la Unidad de Docencia la confirmación de que sus sesiones prácticas pueden realizarse según su calendarización. La entrega del calendario tendrá que realizarse durante el periodo intersemestral, previo a la impartición de la asignatura. El calendario debe incluir un listado estimando la cantidad y características CRETIB (corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico, inflamable y biológico-infeccioso) de los residuos que se generarán, a fin de solicitar los envases adecuados para su disposición.

2.1.3. Respetar el horario establecido para el desarrollo de las prácticas para no interferir con el trabajo de otros Profesores.

2.1.4. Notificar, al menos 24 horas antes, al Responsable del laboratorio las fechas y horarios en los que se presentará al laboratorio para realizar actividades extra-clase (por ejemplo, para preparar soluciones) en un horario distinto al programado. Este tipo de actividades será necesario que se registren en la bitácora del laboratorio.

2.1.5. Notificar al Responsable del laboratorio sobre el almacén temporal de sustancias, soluciones, amortiguadores. El Profesor deberá etiquetar los frascos con los siguientes datos: Nombre del elaborador, fecha de preparación, contenido DETALLADO y asignatura. Cualquier incumplimiento se sancionará con la suspensión de las prácticas.

2.1.6. Entregar al laboratorista una lista del material que requerirá (por equipo de alumnos) para sus prácticas, con al menos 24 horas de anticipación, a fin de que se agilice el proceso de entrega de material. Las prácticas que NO hayan sido planeadas previamente (solicitud de material un día antes) serán SUSPENDIDAS.

2.2. Son responsabilidades del Responsable del laboratorio:

2.2.1. Realizar la solicitud del material requerido por los profesores a la Unidad de Investigación, en los tiempos establecidos.

3. Del manejo de residuos

3.1. Son responsabilidades del Profesor:

3.1.1. Llenar los formatos de residuos correspondientes de acuerdo con lo dispuesto en el reglamento para el manejo, tratamiento y minimización de residuos (anexo), y entregarlo al Responsable del laboratorio al final de cada práctica.

3.1.2. Asegurar que los desechos como guantes, batas, cofias, hisopos, cubrebocas sean colocados en una bolsa ROJA, así como, cualquier material que haya tenido contacto con algún agente biológico-infeccioso.

3.1.3. Asegurar que los desechos como residuos patológicos sólidos, sean colocados en una bolsa AMARILLA.

3.1.4. Asegurar que los contenedores de residuos estén debidamente etiquetados conforme a lo establecido en el reglamento para el manejo, tratamiento y minimización de residuos y que su llenado no exceda el 80% de su capacidad. Las etiquetas correspondientes estarán disponibles en el laboratorio.

3.1.5. Asegurar que las áreas del laboratorio donde se realizaron actividades queden limpias y que la basura esté depositada en los contenedores correspondientes.

3.2. Son responsabilidades del Responsable del laboratorio:

3.2.1. Entregar los residuos perfectamente identificados al responsable de higiene y seguridad en las fechas establecidas, junto con los formatos de residuos correspondientes de acuerdo con lo dispuesto en el reglamento para el manejo, tratamiento y minimización de residuos.

4. De la introducción de material o equipo al laboratorio

4.1. Cuando para la realización de prácticas se requieran materiales, equipos, instrumentos o reactivos que no se encuentren en existencia en los laboratorios, éstos podrán ingresar bajo las siguientes categorías:

a) Préstamo externo: para material o equipo que tendrá residencia temporal (máximo un semestre) en el laboratorio.

b) Donación: para el material o equipo que no será devuelto

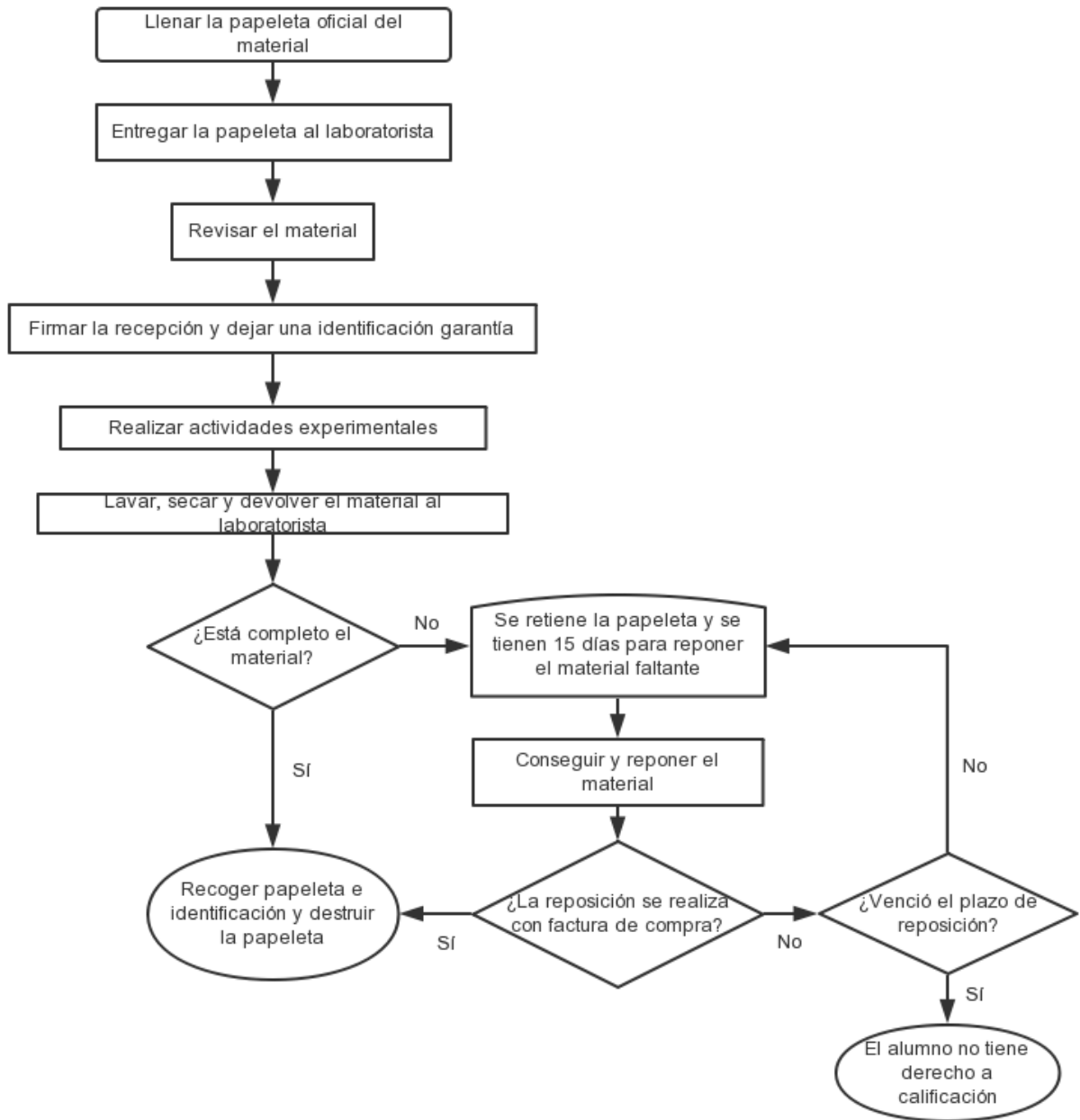
Ambas modalidades ingresarán al correspondiente laboratorio a través del siguiente procedimiento:

- I. Notificación de entrada a través de oficio dirigido a la Coordinación de la Licenciatura y con copia para la Jefatura de Unidad de Investigación, a la Unidad Administrativa y al Responsable del laboratorio, especificando la naturaleza del ingreso, descripción del material y tiempo estimado de residencia.
- II. Programación de ingreso y salida de material con el Responsable del laboratorio y Unidad Administrativa, informando a la Jefatura de Unidad de Investigación.
- III. Registro de ingreso de material externo en la bitácora del laboratorio.
- IV. Notificación de salida de material (en caso de préstamos externos) mediante oficio dirigido a la Coordinación de la Licenciatura con copia para la Jefatura de Unidad de Investigación, a la Unidad Administrativa y al Responsable del laboratorio.
- V. Registro de salida de material externo en la bitácora del laboratorio.

5. Del préstamo y reposición de material en el laboratorio

- 5.1. Para solicitar material o equipos portátiles, los alumnos deberán llenar A MANO el formato oficial de préstamo (papeleta) y dejar una identificación oficial. No se aceptarán formatos distintos.
- 5.2. Es responsabilidad del alumno devolver el material limpio, seco y en las mismas condiciones en las que se le prestó. Al realizarse la devolución completa, el alumno recibirá su credencial y el formato de préstamo de material o equipo firmado por el laboratorista.
- 5.3. En caso de que no se devuelva el material completo se conservará el formato, indicando el adeudo. El alumno será responsable de reponer el material con las mismas características (marca, volumen, especificaciones, etc.) en un plazo máximo de 15 días naturales. Sólo se aceptará material con la respectiva factura o nota de compra.
- 5.4. Cuando se trate de un material o equipo cuya reposición pueda tomar más tiempo al establecido en el punto anterior, el Responsable del laboratorio establecerá el nuevo plazo para la devolución y sugerirá un proveedor cuando sea pertinente.
- 5.5. Si al final del semestre existen adeudos de material, el alumno no tendrá derecho al examen ordinario.

La dinámica para préstamo de material para alumnos se resume en el siguiente diagrama de flujo:



6. Del préstamo de material o equipo entre laboratorios de la licenciatura

6.1. Cuando se requieran materiales, equipos, aparatos, instrumentos o reactivos propios de otro laboratorio de la licenciatura, el Profesor deberá llenar el respectivo formato de préstamo (papeleta) y gestionarlo a través del Responsable del laboratorio.

6.2. El préstamo de material entre laboratorios deberá gestionarse con 24 horas de anticipación a las prácticas, de lo contrario **NO** se realizará.

6.3. Es responsabilidad del Profesor revisar el material que se le proporcionó en otro laboratorio y devolverlo en las mismas condiciones en las que se le entregó, en un plazo máximo de 24 horas. Así mismo, deberá registrarlo de manera detallada en la bitácora de ambos laboratorios involucrados.

7. Del uso de equipos y aparatos

7.1. Es responsabilidad del Profesor supervisar el llenado de las bitácoras por parte de los usuarios cuando se utilicen equipos o aparatos. Esta información es indispensable para asegurar el buen funcionamiento de equipos y solicitar el mantenimiento cuando sea pertinente.

7.2. Es responsabilidad del Profesor notificar al Responsable del laboratorio cualquier irregularidad en el funcionamiento de los equipos.

8. Del uso de bitácoras para alumnos en las asignaturas que así lo requieran

8.1. Tomando en cuenta la relevancia de la bitácora en el trabajo de laboratorio, pero sobre todo su importancia legal en el quehacer forense, se sugiere el uso de bitácoras como práctica común a todas las asignaturas que usan el laboratorio. La bitácora será un cuaderno destinado para uso exclusivo del alumno, de encuadernación permanente (cosido) y preferentemente de pasta dura.

8.2. Las primeras dos hojas se destinarán al uso de portada (en el que se indicarán, como mínimo, la asignatura y el nombre del alumno) y tabla de contenidos o prácticas realizadas (a fin de facilitar la localización de los registros cuando se revisen las bitácoras).

8.3. Las hojas deberán estar foliadas, preferentemente en la esquina superior derecha.

8.4. Para toda actividad experimental deberá registrarse la fecha.

8.5. Todo el contenido deberá escribirse en tinta. No debe usarse lápiz o corrector. En caso de un error debe cancelarse el contenido (con una línea diagonal) y colocarse una firma y fecha junto a la corrección.

- 8.6. El profesor indicará el contenido de la bitácora de acuerdo con las actividades a realizar, como puede ser: título de la práctica, objetivos de la práctica, materiales, equipos y reactivos o sistemas biológicos a utilizar, información de seguridad de reactivos (por ejemplo toxicidad, inflamabilidad o incompatibilidad con otros reactivos, características de la cepa, etc.), cálculos para la preparación de disoluciones, conocimientos previos, reacciones químicas, procedimientos realizados y/o diagrama de flujo, identificación y tratamiento de residuos, recolección de datos, cálculos para obtener resultados, observaciones, resultados, análisis, conclusiones puntuales, referencias consultadas, etc.
- 8.7. En caso de anexarse gráficos o figuras, éstas deberán pegarse a las hojas de la bitácora. Asimismo, se deberá colocar una firma que abarque parte del margen de la hoja pegada y parte de la bitácora y posteriormente se deberá cubrir con cinta adhesiva transparente.
- 8.8. Todo espacio no ocupado deberá cancelarse. No deberán dejarse hojas en blanco.

9. De la evaluación del estado del laboratorio al término del semestre

- 9.1. Es responsabilidad del Responsable de laboratorio:
- 9.1.1. Mantener actualizado el inventario del laboratorio con revisiones periódicas en el transcurso y al final del semestre.
 - 9.1.2. Notificar al profesor antes de iniciar una asignatura, el estado general del laboratorio, haciendo énfasis en el equipo especializado que será utilizado para impartir su clase, estableciendo que durante el desarrollo de la misma él es responsable del buen manejo de los equipos y material con el que cuenta el laboratorio.
 - 9.1.3. Entregar a la jefatura de Investigación un reporte al final del semestre de las anomalías, desperfectos, mejoras y cambios sugeridos para el correcto funcionamiento del laboratorio.

Capítulo 2. Generalidades en el tratamiento de muestras

Se puede definir a la investigación toxicológica forense como el conjunto de procesos analíticos que tienen por objeto el aislamiento, identificación y determinación cualitativa y/o cuantitativa de los xenobióticos contenidos en diferentes matrices biológicas provenientes de un muestreo, según sea el caso: ante-mórtem, post-mórtem o por recolección de indicios biológicos en el lugar de la investigación; con el fin de emitir un dictamen que se constituya en un medio de prueba que contribuya al esclarecimiento de los hechos sujetos a un proceso judicial.

El análisis toxicológico inicia con la selección de la muestra, por lo que el objetivo de este capítulo es orientar al estudiante en forma general sobre las consideraciones necesarias para seleccionar y tomar la muestra, los elementos que debe revisar en una muestra al recibirla en el laboratorio, los cuidados para conservarla en buen estado y finalmente, cómo llevar un buen control sobre la cadena de custodia de forma simultánea.

Es importante aclarar que, independientemente de la matriz en cuestión o del proceso legal al que esté relacionada una investigación, la recolección de las muestras/indicios debe realizarse lo antes posible, sirviéndose de los materiales adecuados, según el tipo de matriz de interés, con el objetivo de aumentar la posibilidad de detectar las sustancias y sus metabolitos que se eliminan de forma rápida del organismo.

Por otro lado, a fin de mantener la validez de los resultados analíticos en el contexto forense, todas las muestras deberán ir acompañadas de la documentación correspondiente (registros de cadena de custodia, llamado, carpeta de investigación, solicitud de análisis, etc.), considerando las etapas de la cadena de custodia como el procesamiento (identificación, documentación, recolección, empaque y/o embalaje), transporte, análisis, almacenaje y destino final. Por este motivo, el personal capacitado con un claro entendimiento de las implicaciones

legales debe realizar o supervisar que todo el proceso de toma de muestra se realice asegurando los derechos del donador, para mantener tanto la privacidad como la dignidad del individuo y al mismo tiempo, garantizar la integridad de la muestra mediante un adecuado embalaje y preservación del indicio, cerciorándose de no ser contaminadas bajo ninguna circunstancia [20].

La Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Crimen (UNODC por sus siglas en inglés) establece las siguientes recomendaciones generales para la recolección de muestras y/o indicios:

- I. El personal en el lugar de la investigación es responsable de las muestras, de su etiquetado, embalaje y transporte, asegurando que la recolección y almacenaje se realicen con la documentación apropiada y las medidas de seguridad pertinentes.
- II. Todo el personal en el lugar de recolección debe tener la capacitación mínima necesaria para conocer el proceso de recolección y su importancia en los resultados de laboratorio.
- III. El lugar de recolección debe ser supervisado y resguardado por el personal capacitado autorizado.
- IV. Antes de realizar la recolección debe cerciorarse de contar con las condiciones sanitarias mínimas.
- V. El lugar de la toma de muestra debe ser registrado para que no exista ninguna sustancia que pueda ser usada para invalidar dicha muestra y se recomienda que no existan agentes de limpieza o sanitización que pudieran inactivar ciertos elementos de la misma. Cuando se trate de la recolección de indicios biológicos en el lugar del hallazgo, debe asegurarse la no contaminación del indicio con algún otro elemento en el lugar, posterior al aseguramiento del lugar.
- VI. La muestra debe recolectarse en un recipiente adecuado que no altere sus propiedades.
- VII. Se debe asegurar la integridad y las condiciones correctas para el traslado y almacenaje.

- VIII. Llenar los formatos de solicitud de análisis, mismos que acompañarán a la muestra al laboratorio.
- IX. El individuo donador, cuando sea el caso, no tendrá permitida ninguna intervención en el manejo de la muestra posterior a la recolección, llámese: embalaje, etiquetado, sellado, transporte o almacenaje.
- X. Todo el personal que intervenga en la recolección, toma o manejo de muestras e indicios biológicos deberá estar registrado en la cadena de custodia detallando su participación y el motivo de la misma con la finalidad de asegurar la integridad y veracidad del proceso legal al que estén relacionados.

Para profundizar en las recomendaciones sobre la toma de muestra, se puede consultar las siguientes referencias: [21] Y [22].

1. Selección de la Muestra.

En esta sección se plantean algunas de las matrices biológicas de elección en individuos ante y post-mórtem, dando una breve descripción de las características de cada una de ellas para que el alumno, con base en los requerimientos de su caso a resolver, pueda tomar una decisión encaminada a la resolución de la(s) pregunta(s) que se le han planteado. Es importante tomar en cuenta que dicha elección queda ligada a todas las consideraciones pertinentes de recolección y procesamiento de muestras/indicios. La información sobre las matrices descritas en este manual debe considerarse solamente como una guía, no son definitivas ni son las únicas que pueden tomarse en cuenta para el análisis toxicológico que quiera desarrollarse.

La elección de la muestra biológica estará determinada por varios factores según el tipo de agente causal y al caso que se investiga. Algunos de los factores más importantes que se pueden nombrar son los siguientes:

- 🧪 Toma de muestra ante mortem o post mortem.
- 🧪 Área de interés (laboral, deporte, etc.).
- 🧪 Tipo de sustancia (sustancias de abuso, tóxicos volátiles, metales, plaguicidas, etc.).
- 🧪 Tipo de intoxicación (aguda, crónica, etc.).
- 🧪 Ruta de exposición (oral, parenteral, pulmonar, etc.).
- 🧪 Procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de xenobióticos o sistema ADME. (Figura 1)

Por lo general, independientemente de la vía de administración empleada, la excreción se produce con mayor facilidad cuando se trata de sustancias polares, por lo que, en la mayoría de los casos de eliminación de xenobióticos liposolubles, lo común es excretar sus metabolitos polares, antes que las sustancias sin alteraciones.

De esta forma, la sangre que está involucrada en el proceso de distribución, será la matriz con una ventana de tiempo menor (horas), seguida de la orina (días), y posteriormente con un rango mayor de tiempo para el análisis los elementos pilosos (semanas o meses), siendo la zona del *vertex* de la cabeza, la matriz que permite identificar exposiciones crónicas a un xenobiótico. Finalmente, el tejido adiposo, que está relacionado con el almacén de xenobióticos liposolubles, será la matriz con el tiempo de vida mayor para realizar un análisis toxicológico. Cada matriz conlleva ventajas y desventajas, entre las que se pueden citar la ventana de tiempo de detección, la estabilidad, la cantidad disponible de muestra y qué tan invasiva se considera la toma de la misma. Con respecto a este último factor, es lógico que sea más fácil obtener una muestra de orina de manera voluntaria ya que no es invasiva, que una biopsia de tejido adiposo (sin mencionar las implicaciones legales de dicha toma de muestra). La toma de muestras de sangre y otros tejidos requieren de una orden judicial si el donador se niega a proporcionarlas voluntariamente.

ADME

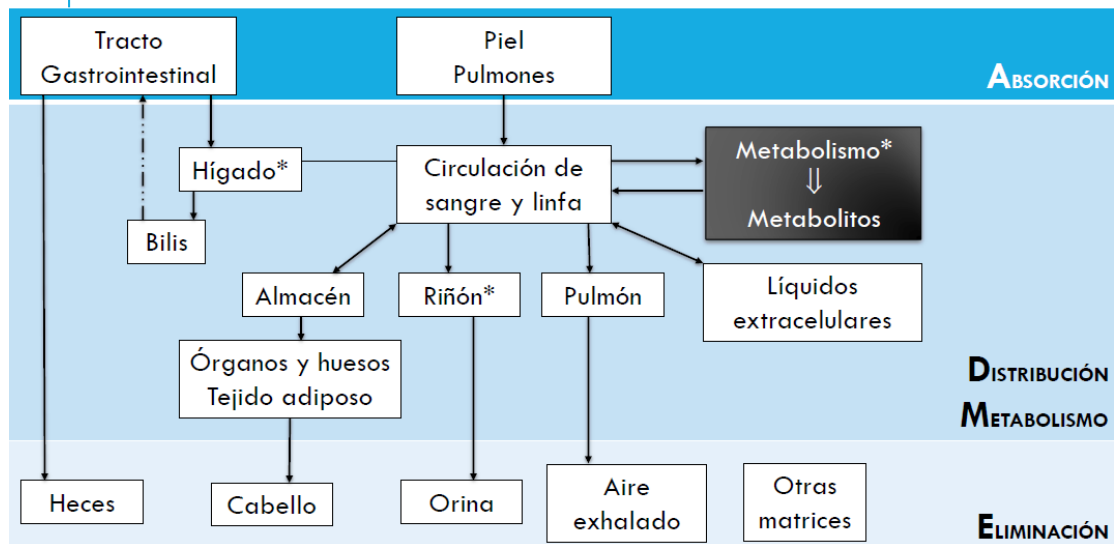


Figura 1. Representación esquemática del proceso de absorción, distribución, metabolismo y eliminación.

La estabilidad de las matrices biológicas es muy variable; hay muestras estables que no requieren ningún tipo de conservación, como las uñas y el cabello porque el cambio en su estructura en función del tiempo es mínima, aún si el tiempo es prolongado; sin embargo, las hay más o menos inestables, que requieren algún tipo de conservación, como el humor vítreo, la orina o el contenido gástrico porque son susceptibles a la pérdida de volumen en función tanto del tiempo como de la temperatura, y por consiguiente son susceptibles al cambio de pH y de la concentración. Finalmente, las hay muy inestables, que exigen una toma rápida (muy cercana a la hora del suceso) o métodos específicos de preservación, como la sangre y los tejidos porque su estructura y composición son sujetos a cambios severos en función del tiempo tales como la desproteización y la putrefacción. No se deben olvidar las características del xenobiótico a identificar, especialmente aquellos con características volátiles.

A finales de los años 70, se reportó por primera vez que el cabello era una matriz adecuada para realizar análisis toxicológicos retrospectivos y desde entonces se han reportado nuevas técnicas analíticas innovadoras para la detección o cuantificación de muchos analitos tales como ketamina, THC (Δ^9 -

tetrahidrocannabinol), THCCOOH (11-nor- Δ^9 - THC- 9- ácido carboxílico), agentes dopantes, cannabinoides sintéticos, entre otros. Por lo tanto, el análisis de cabello es considerado hoy en día como la herramienta más efectiva para investigar casos en los que es necesario examinar una muestra muchos días e incluso meses después de la exposición a cierta sustancia[23].

1.1. Muestreo Ante-Mórtem.

La toma de muestras ante-mórtem debe realizarse bajo la premisa primordial de los Derechos Humanos del individuo y el normativo o jurídico plasmado en diversas leyes, incluida la Constitución; por esta razón, las muestras seleccionadas no pueden poner en riesgo la integridad del individuo y por consiguiente no pueden comprometer la salud física ni mental del sujeto. Esto impide que se tomen muestras de órganos y tejidos, o fracciones de los mismos, imposibilitando de esta manera que se busque una sustancia de abuso o cualquier otra sustancia tóxica en el órgano diana del mismo. Así, por ejemplo, aunque exista la presunción del uso de alguna sustancia hepatotóxica, es imposible tomar una fracción del hígado para el análisis de confirmación necesario. Por otro lado, conociendo la naturaleza de la posible sustancia que se busca es posible conocer la toxicocinética y la toxodinamia tanto del xenobiótico no biotransformado como de sus metabolitos, dejando detrás una gama de posibles matrices de elección dependiendo del tiempo transcurrido desde la exposición, el tiempo de vida media de la(s) sustancia(s) en el organismo, así como el tiempo transcurrido desde la última exposición a la sustancia y la toma de muestra.

En este manual se incluyen solamente las matrices de elección común a manera de orientación para el estudiante. Estas muestras ante-mórtem son:

- ❖ Saliva.
- ❖ Sangre.
- ❖ Orina.
- ❖ Elementos pilosos (ejemplo: Cabello).
- ❖ Uñas, lecho ungueal.

Según el objetivo del análisis pueden elegirse otras matrices que no interfieran con la salud del individuo tales como el aire exhalado para la búsqueda de tóxicos volátiles (cuando sea factible), mucosa nasal para inhalación de sustancias, sudor, materia fecal, cabello de la zona del vertex en el caso de querer establecer una temporalidad, etc. La elección de las matrices quedará sujeta a la decisión de quien las analice y a los medios disponibles con que se cuente en ese momento.

Saliva (fluido oral).

¿Qué es?

La saliva o fluido oral es una solución hipotónica que tiene un pH entre 5.5 y 7.9 en condiciones normales, que al aumentar en su producción, se alcaliniza ligeramente. Es producida por las glándulas salivales microscópicas (situadas en la mucosa oral) y macroscópicas (parótida, submandibular y sublingual), gracias a los reflejos salivales que pueden ser de tipo incondicionados (bucales) o condicionados (cefálicos). La continua combinación de estos reflejos genera alrededor de 1 a 1.5 L de saliva al día con un ritmo de secreción que va de 0.1mL/min hasta 1.8mL/min [24].

¿Cuál es su composición?

Está compuesta en un 98% por una mezcla de agua con electrolitos, 0.7% de proteínas y un 0.26% de glicoproteínas. Los electrolitos más abundantes son: sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}), cloruro (Cl^-) y bicarbonato (HCO_3^-), con una concentración similar a la del plasma. Esta concentración se modifica dependiendo del ritmo de secreción. Las dos proteínas más importantes de la saliva son la amilasa (excretada por las glándulas parótidas) y la mucina (excretada por las glándulas sublinguales y submandibulares). La amilasa o ptialina es una enzima glucolítica que hidroliza los enlaces α (1-4) de los carbohidratos; la mucina por su parte es una glicoproteína lubricante y es la responsable de la viscosidad de la saliva. Otras proteínas presentes son la muramidasa o lisozima que degrada el

ácido murámico de algunas bacterias, la lipasa lingual, un enzima importante para la digestión de la leche, la lactoferrina, una proteína que liga al hierro, el factor de crecimiento epidérmico que estimula el crecimiento de las células de la mucosa gástrica e inmunoglobulinas, por ejemplo: inmunoglobulina A (IgA) [23].

¿Cuál es su función normal en el organismo?

Además del humedecimiento y lubricación de los alimentos que favorece la trituración, mezcla y deglución de los mismos, la saliva tiene múltiples funciones con base en las propiedades de sus componentes.

La mucina además de lubricar los alimentos, también se encarga de proteger el esmalte de los dientes contra los ácidos, bacterias, virus y hongos. Por su parte las enzimas digestivas se encargan de comenzar con la degradación de los alimentos durante la trituración, la α -amilasa degrada almidón, la lipasa degrada grasas ya que actúa sobre los triglicéridos de cadena media como los presentes en la leche y la proteasa degrada proteínas. La lisozima, peroxidasa, histatina y cistatina actúan como agentes antibacterianos mientras que la IgA actúa como agente antiviral. La lactoferrina se une fuertemente al hierro, privando de este elemento a muchos microorganismos bacterianos que dependen de él [24].

Dado su pH, participa en la neutralización del ácido clorhídrico gástrico en la luz esofágica y estomacal participando en la cadena trófica en la mucosa gástrica por su factor epidérmico de crecimiento y se ha comprobado que participa también en la eliminación de metales pesados como el plomo, el mercurio y otras sustancias como el yodo y el tiocianato [23].

Resumiendo, la saliva sirve como agente lubricante, protector o profiláctico y como agente degradante para el inicio de la digestión de los alimentos.

¿Para qué sirve en el análisis toxicológico?

La saliva es una matriz alternativa muy útil tanto en la toxicología clínica, como en la toxicología forense, principalmente para el control y detección de sustancias de abuso debido a que, al ser el resultado de la ultrafiltración de la

sangre, todos los compuestos orgánicos presentes en el plasma pueden encontrarse en el fluido oral en función del tiempo transcurrido desde el uso de la sustancia.

El primer registro del empleo de la saliva como una matriz de interés toxicológico data del año 1875 cuando se reportó etanol en fluidos orales. A partir de los años treinta se demostró principalmente en estudios de toxicología clínica la distribución de solutos saliva-sangre debido a la lipofilidad y a la ionizabilidad de sustancias como esteroides, hormonas, enzimas, anticuerpos y sustancias terapéuticas, entre otras.

A partir de los años setenta se ha estudiado la aplicación de pruebas toxicológicas en casos forenses para fluido oral relacionados con sustancias de abuso principalmente, ya que a pesar de contar con registros de la eliminación de metales pesados por esta vía, su empleo con fines forenses aún no está del todo establecido [23].

Aplicaciones.

En la actualidad la saliva se emplea para pruebas presuntivas, seguidas de estudios toxicológicos en sangre y orina para realizar la cuantificación de las sustancias de interés forense. La principal utilidad de estas pruebas presuntivas se encuentra en los estudios que deben realizarse en el momento y lugar del suceso tales como los casos de accidentes carreteros ocurridos bajo los efectos de sustancias de abuso.

De igual forma, estos análisis presuntivos pueden emplearse en casos de dopaje en competencias deportivas y en estudios toxicológicos de rutina en el área laboral con el objetivo de detectar sustancias de abuso que pudiesen modificar el desempeño de ambas actividades [23].

Ventajas, desventajas y consideraciones importantes.

El fluido oral, al igual que la orina, presenta la ventaja de tener un muestreo mínimamente invasivo, de fácil acceso sin tener que violar la integridad física del individuo.

Ofrece también la ventaja de presentar una mayor concentración de xenobiótico no biotransformado frente a la concentración de los metabolitos permitiendo de esta manera que con las concentraciones registradas en la sangre se obtenga la información toxicocinética necesaria para correlacionarla con los efectos de la sustancia.

Cuando es necesario realizar una prueba en el lugar del suceso y no se puede tomar una muestra de orina, la saliva presenta una opción sumamente importante debido a la rapidez de las pruebas presuntivas y a que no es necesaria ninguna condición especial en su muestreo.

Los resultados de las pruebas en saliva presentan la ventaja de que un resultado positivo indica un uso sumamente reciente de la sustancia de interés y tienen una total concordancia cualitativa con los xenobióticos no biotransformados, o algunos metabolitos en casos especiales, con los resultados totales de sangre.

Se puede emplear también como un medio de optimización para las concentraciones de corte en los exámenes de sangre total gracias a que, al tener un resultado positivo en saliva, disminuye el número de falsos positivos o negativos en sangre.

Similar a las demás matrices, el empleo de fluido oral muestra ciertas desventajas por la naturaleza de la muestra. Una de estas desventajas es que el volumen de la muestra es reducido y por consiguiente la cantidad de analito que se puede encontrar en ella es aún menor que en otras matrices de análisis. Además de las limitaciones anteriores, la variación de pH en el fluido oral es mayor que en las demás matrices de interés ya que este puede alterarse por los alimentos, bebidas y por el consumo de sustancias de abuso modificando de esta manera el predominio de las especies que pueden estar contenidas en dicha matriz; así pues, los resultados de las pruebas presuntivas dependerán en gran medida del pH del fluido al momento de la prueba e incluso la relación de las sustancias (saliva/sangre) se verá modificada dando un gran índice de variación de los análisis.

Otra desventaja que se encuentra en esta matriz es que el tiempo de detección es corto, ya que la mayoría de las sustancias que pudiesen encontrarse

en la saliva desaparecen de la matriz en un tiempo promedio de 12 horas y de hasta 48 horas después de la administración para sustancias de carácter básico.

De igual manera, para la mayoría de las sustancias de abuso no existe cercanía entre la concentración encontrada del xenobiótico y sus metabolitos en saliva con respecto a la concentración hallada en los análisis de sangre total debido a las variaciones interpersonales; por tanto, no se puede conocer o estimar la concentración en sangre de cierta sustancia a partir de la concentración encontrada en el fluido oral [23].

Sangre.

¿Qué es?

La sangre es un tejido ligeramente alcalino (pH= 7.4), viscoso de color rojo brillante a oscuro que constituye alrededor del 7% del peso corporal, con una densidad de 1.088 g/mL. El volumen total de sangre en un adulto es de aproximadamente 5L.

¿Cuál es su composición?

Está compuesta de elementos formes: glóbulos rojos (GR; eritrocitos, hematíes), glóbulos blancos (GB; leucocitos) y plaquetas, suspendidos en un componente fisiológico líquido (matriz extracelular) denominado plasma que no hay que confundir con el suero.

El plasma es un líquido amarillento que **contiene tanto al suero, como a la fibrina y otros factores de coagulación**. Conformar el 55% del volumen total de la sangre y su principal componente es el agua.

El suero por su parte, es un líquido en el cual están suspendidas células, plaquetas, compuestos orgánicos y electrolitos. Su principal componente es el agua con cerca del 90% de su volumen, las proteínas forman el 9% y las sales inorgánicas, iones, compuestos nitrogenados, nutrientes y los gases el 1% restante [25]. A diferencia del plasma, el suero es el componente sanguíneo resultante de permitir la coagulación y posterior separación del fibrinógeno y los demás factores de coagulación.

¿Cuál es su función normal en el organismo?

Principalmente, la sangre lleva nutrientes del sistema gastrointestinal o cualquier otra ruta de absorción a todas las células del cuerpo y desplaza subsecuentemente los productos de desecho de estas células a órganos específicos para su eliminación, pero realiza la misma función cuando una sustancia ajena al organismo es introducida en él, es decir, transporta al xenobiótico a través del cuerpo para después desplazar los productos de desecho de las células, ya sean más tóxicos o no, y llevarlos a los órganos que se encargarán de su excreción. También transporta otros componentes como los metabolitos, hormonas, moléculas de señalamiento y electrólitos. La sangre contribuye para regular la temperatura corporal y mantiene el equilibrio ácido-básico y osmótico de los líquidos del cuerpo, equilibrio que puede ser alterado por la presencia de sustancias ajenas al organismo [26].

¿Para qué sirve en el análisis toxicológico?

Debido a que la sangre es un vehículo ideal para el transporte de sustancias, se busca en ella la presencia de xenobióticos que pudieran ser de interés forense ya que, independientemente de la naturaleza de la sustancia, una porción de ella y en menor medida de sus metabolitos, llega al torrente sanguíneo para su distribución o redistribución, por lo cual la sangre es una de las matrices biológicas de mayor elección para los análisis toxicológicos, pero tiene como principal factor determinante la temporalidad de la aplicación del análisis.

Un resultado positivo en la sangre para cierta sustancia puede ser prueba de que ha existido exposición a ella en un plazo corto (normalmente, menos de 48 horas) [27].

Tanto para la sangre como para las otras matrices, la determinación de la presencia de cualquier xenobiótico en un espécimen biológico suele constituir un indicador de exposición, pero la detección de un compuesto en la sangre por sí sola no lleva a la resolución de un caso, sino que esta información y la presencia

de otros indicios en el lugar de la investigación (residuos de la sustancia consumida, etc.) solamente nos brindan datos sobre el supuesto suceso. Además, dadas las variaciones peculiares del régimen de biotransformación de las sustancias en función del individuo (raza, sexo, edad, tipo de metabolizador, etc.), suele ser difícil estimar la dosis o la hora exacta de su empleo [27].

En cambio, no detectar una sustancia o su metabolito en la sangre, es decir, un resultado negativo, no significa en todos los casos que no haya existido la exposición a ésta, menos aún en la sangre cuando la ventana de tiempo de análisis es tan pequeña, en todo caso sólo podría asegurarse que no existen rastros de una reciente exposición.

Aplicaciones.

Dos ejemplos claros que nos demuestran la importancia de conocer los tiempos aproximados de eliminación de las sustancias en la sangre son el etanol y el Δ^9 -THC. La búsqueda del etanol y sus metabolitos arrojarían un resultado negativo en un análisis sanguíneo realizado una semana posterior a algún ilícito cometido bajo los influjos de su consumo, mientras que el Δ^9 -THC y sus metabolitos darían un resultado positivo en un análisis de sangre realizado en el mismo tiempo y con el mismo objetivo. Dadas estas condiciones podría decirse que en el caso del alcohol no existe evidencia de un consumo reciente, pero por su parte, para el Δ^9 -THC podría afirmarse, en función de la relación de sus concentraciones en sangre y orina, si el consumo fue reciente o no, información de vital importancia en el dictamen de alguna sentencia para ser empleada, por ejemplo, como agravante en la resolución de algún caso.

Los análisis en la sangre, aún con sus limitaciones, siguen siendo indicadores primordiales en exposiciones y factores de riesgo a la salud para ciertas sustancias, por ejemplo, en las exposiciones a metales como el plomo, arsénico, cobre, etc., la sangre funge como indicador del equilibrio entre la cantidad de metal que es absorbida, la que está siendo transportada por la sangre y la que se deposita en los tejidos. Estos indicadores pueden emplearse periódicamente en

exposiciones de tipo laboral en las que la exposición es prolongada, estable y muchas veces no controlada en función de la salud del trabajador.

Ventajas, desventajas y consideraciones importantes.

Los análisis realizados en sangre tienen la ventaja de ser efectivos, dependiendo del tiempo de vida media de la sustancia, generalmente cuando la última exposición a ella no tiene más de 48 horas desde su consumo hasta la toma de la muestra lo cual nos dan un primer acercamiento en cuanto a la temporalidad del suceso; sin embargo, tiene la desventaja de que la toma de muestra ante-mórtem es invasiva lo que ocasiona con frecuencia que conseguir este espécimen resulte más difícil jurídicamente hablando. Otra desventaja que presenta la sangre es que requiere de ciertas condiciones mínimas para garantizar su preservación desde la toma de muestra con un contenedor adecuado, la temperatura de transporte, su embalaje, entre otras, que de no ser correctamente aseguradas, pueden provocar un resultado poco confiable.

Un parámetro a considerar al elegir la matriz biológica es el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la sustancia en la sangre. Los valores de $t_{1/2}$ pueden resultar útiles para evaluar el plazo en que cabría prever que una sustancia permaneciera en la sangre o en la orina tras su ingestión y puede ayudar a estimar y verificar el momento del supuesto suceso.

Tabla 2. Períodos de tiempo de vida media ($t_{1/2}$), para algunas benzodiazepinas (United Nations International Drug Control Programme, 2014 [27]).

Benzodiazepina	$t_{1/2}$ (horas)
Oxazepam	8
Lorazepam	12
Clonazepam	19-40
Diazepam	20-30
Triazolam	1.5-3 (metabolito: 4)
Clobazam	10-20 (metabolito: 50)
Prazepam	3 (metabolito: 65)

Tomando como ejemplo algunas benzodiazepinas mostradas en la Tabla 2, podemos ver que este tiempo de vida media es distinto para cada sustancia y por consiguiente conocer este dato es de primordial importancia para tomar en cuenta o descartar a la sangre como una posible matriz de interés analítico [23].

Orina.

¿Qué es?

La orina es un líquido normalmente estéril (hasta que llega a la uretra) con un pH entre 4.6 y 8 que es un subproducto del cuerpo secretado por los riñones a través de un proceso llamado micción.

¿Cuál es su composición?

El agua representa el 95% de la orina mientras que el 5% restante está compuesto por desechos nitrogenados (urea, ácido úrico, creatinina, amoníaco, etc.), electrolitos (iones de sodio, iones de potasio, iones de amonio, iones cloruro, etc.), pigmentos (urocromos, productos de ruptura de hematófies, etc.), hormonas y finalmente toxinas de enfermedades bacterianas o infecciosas [25].

¿Cuál es su función normal en el organismo?

El metabolismo celular genera numerosos subproductos, muchos ricos en nitrógeno, que deben eliminarse de la circulación sanguínea. Estos subproductos son finalmente expulsados del cuerpo, por medio de la orina, durante la micción que es la vía principal para la excreción del cuerpo de productos químicos hidrofílicos.

Además de los subproductos generados por el metabolismo celular, en la orina también se eliminan los metabolitos generados por la biotransformación de los xenobióticos que ingresan al organismo.

Los metabolitos que son excretados a través de la orina llegan a ella por medio de la sangre ya que los riñones reciben alrededor de 1220 mL de sangre cada minuto de los cuales se obtiene un filtrado glomerular de 125 mL/min, dando un total de 180 L de filtrado al día, para después excretar solamente de 1.5 a 2 L en

forma de orina. Además del proceso de filtración glomerular, también los procesos de secreción tubular activa y de reabsorción tubular pasiva intervienen en la excreción de dichos metabolitos [25].

¿Para qué sirve en el análisis toxicológico?

Aunque cada caso tiene su historial y peculiaridades que pueden justificar el empleo de una matriz en lugar de otra, la orina suele ser la muestra de elección para los exámenes toxicológicos porque la mayoría de los xenobióticos, una vez biotransformados a sus respectivos metabolitos en la fase I, son conjugados con otras moléculas. Una enorme gama de metabolitos de Fase I se conjuga con ácido glucurónico, lo que aumenta su carácter hidrofílico y, por consiguiente, su solubilidad en la orina. Los metabolitos que al ser conjugados disminuyen su carácter hidrofílico, suelen ser eliminados por vías como heces e inclusive algunas por las uñas o el cabello, dependiendo de su naturaleza y conjugación. Además de los metabolitos eliminados a través de la orina, también pueden realizarse estudios clínicos para cuantificar la cantidad de electrolitos presentes en la muestra, dato que puede relacionarse con la exposición a compuestos orgánicos volátiles (VOC por sus siglas en inglés), que son hoy en día, sustancias de abuso con un incremento significativo en su consumo.

Aplicaciones.

Entre las sustancias que pueden analizarse en la orina se encuentran la mayoría de las sustancias de abuso como barbitúricos, benzodiazepinas, anfetaminas, opiáceos, cannabinoides, etc.

También se pueden analizar casos relacionados con herbicidas, insecticidas y la mayoría de los demás plaguicidas. No es muy común que los metales pesados, como el plomo, el mercurio, etc. que ingresen al organismo sean eliminados a través de la orina, pero cuando las concentraciones en el organismo son muy elevadas puede haber incluso presencia de partículas minúsculas precipitadas en ella, caso en el cual, un análisis de dichos metales sería factible utilizando esta matriz.

Ventajas, desventajas y consideraciones importantes.

Una de las ventajas que presenta la orina, en comparación con la sangre, es que tiene una ventana mayor de tiempo para la detección de xenobióticos y/o sus metabolitos; sin embargo, ambas tienen la desventaja de que deben obtenerse y refrigerarse lo antes posible, cuanto antes se obtenga un espécimen después de los hechos que se investigan, tanto mayor será la posibilidad de detectar los compuestos de interés, considerar la estabilidad del xenobiótico y/o su metabolito, así como el tipo de contenedor en el que es empacado y embalado.

Además de los análisis toxicológicos, la orina presenta la ventaja de permitir su empleo en estudios clínicos con validez jurídica, en la realización de exámenes genéticos, entre otros.

Una desventaja sumamente trascendente es que las muestras de orina pueden ser diluidas, adulteradas e incluso reemplazadas durante la recolección de la muestra, pero tiene la ventaja de no depender de un procedimiento invasivo.

Otra de sus desventajas es que para realizar un análisis en un tiempo relativamente corto, utilizando una menor cantidad de reactivos y un menor número de ensayos, es indispensable conocer los metabolitos más comunes de las sustancias de las que exista presunción a fin de realizar un análisis enfocado a esa familia de compuestos y no tener que realizar varias extracciones ya que la cantidad de muestra disponible para realizar el análisis completo y su dictamen es limitada, lo que lleva a tener un número reducido de ensayos, aún más sabiendo que debe resguardarse una considerable cantidad de la misma muestra como testigo en caso de que se desee realizar un segundo análisis. En la Tabla 3 se muestran, a manera de ejemplo, los metabolitos conocidos para algunas sustancias de abuso, la relación porcentual de la biotransformación con respecto a la sustancia no biotransformada, los datos de excreción y el tiempo de vida media del xenobiótico original. Estos datos pueden orientar al analista para saber cuáles son los metabolitos que se podrían encontrar en la orina y si alguna fracción del compuesto original podría detectarse [28].

Tabla 3. Metabolitos, tiempo de vida media e información de la excreción de diferentes sustancias de abuso (United Nations International Drug Control Programme, 1997 [28]).

Sustancia de abuso	t _{1/2} (hr) Plasma	Excreción del xenobiótico no biotransformado	Metabolitos conocidos	Abundancia con respecto a la sustancia de abuso inicial
Pentobarbital	> 48	< 1%	3'-hidroxipentobarbital	7 %-D, 30 %-L
			3'-oxipentobarbital	7-14%
			Metabolito 3'-carboxi	10-15 %
			Conjugado N-glucósido	13 %
Cocaína	<2	1-5%	3-benzoiloxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-4-ácido carboxílico (Benzoilecgonina)	<80%
			Ecgonina metil ester	<10%
			Cocaetileno	Trazas
Butabarbital	≈40	5-9 %	3'-hidroxibutabarbital	22-28 %
			3'-oxobutabarbital	14-18 %
			3'-carboxipropil	4-8 %
Anfetamina	12-15	30-40%	p-hidroxianfetamina conjugada	3%
			bencilmetilcetona conjugada	3%
			ácido hipúrico	16%
			Benzoilglucuronido	4%
Ciclobarbital	8-17	< 10 %	5-(3-oxociclohex-1-enil)-5-etil ácido barbitúrico	< 90 %
1-Δ ⁹ -THC	0.5	3%	11-OH- Δ ⁹ -THC (a)	>70%
			11-nor-Δ ⁹ -THC-9-ácido carboxílico (b)	<65%
Fenobarbital	50-150	25-67 %	p-hidroxifenobarbital (mitad conjugada)	17 %
			N-glucopiranosilfenobarbital	> 30 %
			Dos metabolitos dihidrodil	Trazas
			Hidroximetilfenobarbital	Trazas

Cabello.

¿Qué es?

Es un apéndice que contiene queratina que crece a partir de una raíz ubicada en una cavidad de la piel llamada folículo. Los folículos pilosos se

extienden desde la dermis a través de la epidermis y la capa córnea en la superficie de la piel; en los seres humanos, cubren un alto porcentaje de la superficie del cuerpo. Químicamente es una red polimérica reticulada, parcialmente cristalino-orientada, que contiene diferentes grupos funcionales químicos con el potencial para unirse a moléculas pequeñas [23].

¿Cuál es su composición?

Se compone de aproximadamente 65-95% de proteínas, 15-35% de agua, 1-9% de lípidos y 0.25-0.95% de minerales. En particular, los lípidos se derivan principalmente de sebo y la secreción de las glándulas apocrinas de la piel y constan de los ácidos grasos libres, mono-, di – y triglicéridos, ésteres de cera, hidrocarburos y alcoholes. El color del cabello está relacionado con la cantidad y distribución de los pigmentos del cabello, principalmente la melanina. Hay semejanzas estructurales básicas entre el cabello de diferente color, origen étnico y región del cuerpo [23].

¿Cuál es su función normal en el organismo?

Dado que las funciones vitales del cabello en nuestra especie son prácticamente nulas ya que únicamente proporciona una protección mínima al cuero cabelludo y, en general, a la piel de la radiación solar o cambios ligeros de temperatura (no más de un par de grados); se hablará en términos generales de su fisiología.

El crecimiento del cabello normalmente se da a través de tres etapas consecutivas: anágena o de crecimiento (4 a 6 años), catágena o de transición (un par de semanas) y telógena o de reposo (4 a 6 meses). Estas tres etapas dan por resultado una estructura abundante en enlaces de tipo disulfuro (entre otros), que definirán, según su disposición espacial, la estructura general del cabello (lacio, rizado, etc.).

El cabello crece entre 0.7 y 1.5 cm por mes con un radio que varía según el folículo (factores medioambientales) y el individuo (factores fisiológicos).

A la estructura del cabello se incorpora una gran variedad de sustancias desde el torrente sanguíneo por medio de difusión pasiva debido a que cada folículo está rodeado por una red capilar muy densa. Las glándulas sebáceas contribuyen también a la incorporación de ciertas sustancias debido a que tienen contacto directo con el canal del folículo. Finalmente pueden incorporarse partículas directamente de la piel cercana al folículo a través de la raíz del cabello [23].

Esta incorporación al cabello está determinada principalmente por las propiedades fisicoquímicas de la sustancia pero de manera general, las partículas pequeñas, de mayor hidrofobicidad y la presencia de grupos ionizables favorece la incorporación de una sustancia a la estructura del cabello.

¿Para qué sirve en el análisis toxicológico?

Una de las matrices de elección para determinar la temporalidad de la exposición a ciertas sustancias es el cabello ya que por su estabilidad puede ser útil para identificar exposiciones crónicas, siempre y cuando la exposición sea frecuente ya que en caso contrario, la concentración de la sustancia en el cabello será mínima, tal vez incluso menor que el límite de detección de todas las pruebas disponibles.

La propiedad determinante en la aplicación del análisis toxicológico a esta matriz es la longitud de la muestra ya que la concentración del xenobiótico dependerá de qué tanto haya crecido el cabello desde el consumo o exposición a la sustancia. Teniendo en consideración el ritmo de crecimiento mensual, es posible inferir que la determinación de la temporalidad de la exposición será impedida si el sujeto cortó recientemente su cabello, ya sea con fines estéticos o para obstruir una investigación en proceso. Pragst y Balikova reportaron en su investigación que a 12-15 cm alejados de la raíz, el cabello puede retener solamente el 4% de la concentración original de alguna droga; mientras que será mayor en función de la cercanía con el folículo [29].

Gracias a que se incorpora una gran variedad de sustancias a la estructura del cabello por los diferentes procesos de difusión, entre ellos directamente del torrente sanguíneo, es posible buscar en esta matriz tanto al xenobiótico como a sus metabolitos.

Debe aclararse que existen muchas diferencias entre el cabello y el vello, principalmente en el tamaño del folículo y en algunos vellos la existencia de una doble médula pulpar. Adicional a esto, el rango de crecimiento es diferente para el cabello, el vello púbico, el axilar, el facial y el demás vello corporal. Algunos estudios han demostrado que existe una concentración menor en el cabello en comparación con el vello de otras partes del cuerpo para sustancias como los opioides, metadona, cocaína, metanfetaminas y cannabinoides; sin embargo, es función del experto diferenciar y decidir cuál de las diferentes opciones elegirá, ya sea cabello o algún tipo específico de vello para llegar a su objetivo. Por otro lado, se ha observado y reportado en diversos estudios que el crecimiento del cabello en la zona del vertex, se presenta de forma homogénea, no así en otras zonas de la cabeza, ni en axila o zona púbica, y esto permite realizar estudios de temporalidad o cronicidad.

Aplicaciones.

Según la UNODC, el uso más frecuente de esta matriz como medio de análisis se encuentra en las investigaciones que requieren una comprobación y al mismo tiempo una temporalidad sobre el uso de sustancias de abuso, en particular de drogas (opiáceos, cannabinoides, anfetaminas, etc.), en casos relacionados con crímenes y otros contextos sociales.

La principal justificación como prueba de temporalidad está basada en que no siempre se puede obtener un historial clínico confiable a través de declaraciones y en la mayoría de los casos, los periodos de detoxificación están mal reportados. Para las áreas laborales estos análisis periódicos representan un alto porcentaje de aplicación ya que a través de ellos pueden realizarse estudios sobre los valores de exposición inherentes al área de trabajo y a la duración de la jornada, además de incluir un estudio sobre la presencia de sustancias de abuso que pudieran alterar la

capacidad del trabajador en el desarrollo de su profesión. En estos casos laborales se incluyen frecuentemente los metales pesados y los plaguicidas, además de la mayoría de las sustancias de abuso con algunas reservas por el índice alto de falsos positivos; por ejemplo, los cannabinoides que tienen una mínima incorporación en la matriz del cabello.

Recientemente se ha estudiado la posibilidad de incluir al cabello en análisis relacionados al consumo crónico de alcohol, no de forma directa ya que esto no es posible, pero sí a través de la medición de algunos de sus metabolitos minoritarios como el etil glucuronido (EtG), etilsulfato y ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) [23].

Ventajas, desventajas y consideraciones importantes.

El cabello presenta grandes ventajas frente a muestras biológicas como la sangre y la orina, principalmente porque gracias a su estructura no es fácil disminuir la concentración del xenobiótico en esta matriz, no se puede adulterar su contenido gracias al proceso de lavado al que es sometido previo a su análisis, no requiere de ninguna condición para su conservación más que un empaque bien sellado y la recolección de cabello es realizada por el experto en cuestión.

En comparación con la sangre, la ventaja indudable que presenta el cabello es que su procedimiento de recolección es mínimamente invasivo, lo que facilita su ejecución aun sin contar con condiciones médicas sanitarias; sin embargo, presenta la desventaja de que la concentración en el cabello tanto del xenobiótico como del metabolito es mucho menor que la concentración en la sangre.

Su análisis ha adquirido gran popularidad debido a que presenta una ventana mayor de tiempo de análisis en comparación con otras matrices, situación que es en gran medida la causa principal de su empleo con mayor frecuencia hoy en día y justificación necesaria para la búsqueda de nuevas innovaciones en sus técnicas.

Tabla 4. Datos comparativos entre sangre, orina y cabello.

Matriz	Tiempo de análisis factible	Detección	Exposición	Tipo de Muestreo	Condiciones de Preservación
Saliva	Minutos- Horas	Xenobiótico	*Aguda	No invasiva	*Refrigeración. *Contenedor de plástico. *Contenedor estéril sellado.
Sangre	Horas-Días	Xenobiótico Metabolito	*Aguda	Sumamente invasivo	*Refrigeración. *Contenedor específico. *Contenedor estéril sellado. *Conservadores químicos.
Orina	Días- Semanas	Xenobiótico no biotransformado o metabolitos hidrofílicos	*Aguda *Crónica	No invasivo	*Refrigeración. *Contenedor de plástico. *Contenedor estéril sellado.
	Meses				*Congelación (-20°C)
Cabello	Meses	Xenobiótico	*Crónica	No invasivo	*Contenedor estéril sellado.

En resumen, la Tabla 4 muestra, de forma comparativa, algunas de las propiedades o características del empleo de cada una de las cuatro matrices antes mencionadas para facilitar la comprensión de su inclusión en los análisis toxicológicos.

De forma similar, en Figura 2 se muestra una línea de tiempo en la que se plasma el periodo durante el cual es factible emplear una matriz con fines de

análisis para la detección, identificación y cuantificación de xenobióticos según el caso en particular que se esté investigando.

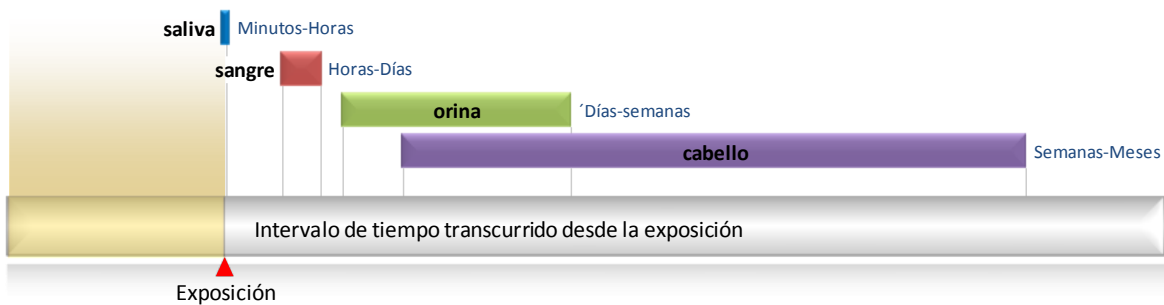


Figura 2. Intervalo de tiempo transcurrido desde la exposición para el análisis útil de una muestra biológica.

1.2. Muestreo Post-Mórtem.

La toxicología forense post-mórtem al igual que la ante-mórtem tiene por objeto el análisis de matrices biológicas para identificar la presencia de xenobióticos o sus metabolitos que tengan alguna relación con el suceso al que esté sujeto el análisis en cualquiera de las áreas que abarca la toxicología. Como su nombre lo dice, las muestras que se utilizan en un análisis post-mórtem son recolectadas de cadáveres en los que se desea descartar o confirmar una posible intoxicación, ya sea intencional o accidental, provocada por la exposición a alguna sustancia de forma reciente o por un tiempo prolongado.

La toxicología forense post-mórtem se emplea muy frecuentemente en los casos en los que se sospecha de un deceso causado por el consumo de sustancias de abuso y/o algún tóxico que puede inferirse por los signos perimórtem hallados en el cadáver. En decesos por exposición parenteral reciente, el sitio de la inyección puede ser aún visible mientras que una exposición por la vía oral puede inferirse por una gran cantidad de la sustancia en el estómago que no se ha absorbido. En algunos casos, la inspección del lugar de la investigación puede proporcionar información que permita proponer la causa aparente de muerte o el agente que pudo causar el deceso, sin embargo, un laboratorio de análisis toxicológico tiene la necesidad de identificar y cuantificar las sustancias presentes

en las muestras biológicas con el fin de determinar si estas sustancias causaron o contribuyeron en la muerte del individuo [30].

Las investigaciones toxicológicas también son importantes en muertes en las cuales se presume de un homicidio, en muertes relacionadas con la exposición a xenobióticos e incluso en muertes por causas naturales. Por ejemplo, en la muerte ocasionada por un infarto, que es una causa de muerte natural que puede ocurrir con o sin evidencias anatómicas, la oportunidad de detectar niveles considerables en la sangre de medicamentos para prevenir éste incidente puede indicar si la persona estaba bajo tratamiento médico o no. En el caso contrario, si se encuentra en la sangre del cadáver algún fármaco que se indica para el control de algún padecimiento que no tenía en su historial médico, es necesario investigar la razón de su consumo [30].

En general, se somete a una investigación criminal cualquier deceso por causas no naturales o naturales si es que existen sospechas de alguna intoxicación. Las muertes que tienen involucrado algún trauma, rasgos de violencia, las muertes que son potencialmente suicidios, las resultantes de actividades criminales (robos, violación, secuestros, etc.), y las muertes repentinas o súbitas son objeto de estudios toxicológicos post-mórtem para identificar o coadyuvar al dictamen de la causa de muerte [30].

Para que los resultados de los exámenes toxicológicos tengan la interpretación adecuada y se logre un buen entendimiento entre los miembros presentes en la audiencia cuando se presente en juicio se debe conocer de principio a fin los procedimientos a los que han sido sometidas las muestras desde su procesamiento en el lugar de investigación, su traslado, la entrega al laboratorio que realiza los análisis y sobre todo del mismo análisis que será la información relevante para el área toxicológica (de la misma forma que ante-mórtem). Debido a estas razones es de vital importancia el seguimiento de la cadena de custodia que puede ser un factor determinante para invalidar un resultado de cualquier investigación toxicológica [30].

La recolección de muestras para una investigación post-mórtem se realiza en el momento de la necropsia por el patólogo, quien tiene que asegurarse de proporcionar las matrices apropiadas para el análisis toxicológico, además de asegurar que dicha recolección se lleve a cabo sin contaminar las muestras para que no exista ningún elemento que pudiese complicar o cambiar el resultado de un análisis [30].

El patólogo comúnmente proporciona al toxicólogo una serie de matrices de rutina que sustentan la búsqueda de alguna sustancia en particular, así pues, para la búsqueda de sustancias de abuso sería innecesario proporcionar una matriz ósea (aunque no inútil), mientras que una matriz como la orina sería la muestra ideal para el análisis deseado [30]. Por el contrario, esa matriz ósea sería útil en la detección de exposiciones crónicas de metales como el plomo; mientras que la muestra de orina no aportaría mucha información. La elección de la muestra, depende en buena medida la finalidad probatoria del análisis y de la toxicocinética es decir, de la distribución del xenobiótico y sus metabolitos, así como el tiempo de vida media en cada una de las matrices.

Para las investigaciones post-mórtem, podría recolectarse cualquier parte del organismo (en sentido figurado), puesto que el motivo lo justifica, sin embargo, realizar un estudio toxicológico a cada parte del cuerpo implicaría un incremento importante en el tiempo requerido para entregar resultados, por lo que conocer la finalidad probatoria facilita la elección correcta de la matriz.

La investigación post-mórtem puede requerir también estudios clínicos o análisis químicos, casos en los cuales, el humor vítreo es la muestra de elección. Los valores de nitrógeno de la urea vítrea son evidencia útil en la determinación de muerte por deshidratación o por un mal funcionamiento renal, mientras que un resultado elevado en la glucosa vítrea podría indicar una hiperglucemia ante-mórtem porque las concentraciones de glucosa en la sangre cambian rápidamente después de la muerte. En esta sección, al igual que para los análisis ante-mórtem, solamente se incluyen las matrices más comunes para análisis toxicológicos, entre las cuales están:

- Sangre (central y periférica).
- Orina (en caso de ausencia de orina puede tomarse la bilis).
- Elementos pilosos.
- Bilis.
- Contenido gástrico.
- Hígado (algún otro órgano o tejido).
- Uñas y lecho ungueal.

Estas matrices, en especial para los casos post-mórtem, no son las únicas y puede incluirse el análisis a cualquier otra matriz deseada si su empleo es justificado en el aporte de información que proporcionan los medios de prueba.

Para **la sangre, la orina y el cabello** no se incluye información adicional en esta sección puesto que, a pesar de que algunas de sus propiedades cambien en el estado post-mórtem, se busca en términos generales las mismas sustancias y por las mismas razones que ante-mórtem.

Es importante mencionar que después de la muerte las propiedades de estas matrices cambian debido a los procesos fisiológicos desencadenados por el colapso paulatino de la homeostasis, desde las células hasta los tejidos de cada órgano. Es importante dejar en claro que estos fenómenos producen los procesos de redistribución ocasionados por estos cambios en el cadáver y serán un factor determinante para la elección de la muestra a analizar. Así pues, es evidente pensar que mientras más rápido sea el muestreo post-mórtem, más apegadas al estado ante-mórtem serán las matrices y por consiguiente, las condiciones de cada muestra serán más similares a las condiciones en las que se encontraba el sujeto antes de su muerte, lo que nos guiará a obtener un resultado con mayor veracidad. La redistribución de los xenobióticos y sus metabolitos se verá influida por los fenómenos cadavéricos en el organismo en función del tiempo transcurrido desde la hora de muerte [31].

Existen dos tipos de fenómenos cadavéricos: Fenómenos cadavéricos tempranos, presentes inmediatamente después de la muerte (algor mortis, hipostasia y rigor mortis); y Fenómenos cadavéricos tardíos, que son aquellos procesos que producen la degradación del cadáver (autólisis, tanatoquimia y putrefacción). De estos procesos, los fenómenos tardíos influyen en mayor medida en la redistribución ya que generan nuevas sustancias que modifican las propiedades fisicoquímicas no sólo de los fluidos corporales, sino también de los tejidos del organismo, cambiando de esta manera muchos valores de parámetros como el pH y la composición de las matrices [32]. El considerar los factores que afectan a las sustancias por medio de la temporalidad desde ocurrido el suceso, hasta el muestreo, queda entonces como requisito para la elección de las muestras a recolectar.

Dado que se tiene como factor limitante muchas variables como el proceso de biotransformación de cada individuo ante-mórtem, los procesos fisiológicos una vez ocurrida la muerte, el tiempo transcurrido desde el deceso hasta la recolección de la muestra, entre otras que influyen en un análisis post-mórtem, se plasman a continuación las propiedades de las matrices en un periodo cercano a la muerte para obtener un panorama general de sus características y por qué se eligen para el análisis.

Sangre.

La sangre debe recolectarse en todas las necropsias ya sean completas o parciales, pero a diferencia del caso ante-mórtem, se toman dos tipos de sangre; una muestra proveniente directamente del corazón y otra muestra que sea de una zona periférica. El volumen también difiere ya que se requieren mínimo 10 mL de cada muestra, en los casos en los que la sangre del corazón ha sido contaminada por un traumatismo o por alguna droga, la muestra alternativa (periférica), puede ser suficiente para el análisis. Si existen hematomas o coágulos subdurales y/o epidurales, se debe recolectar también esa sangre por su utilidad cuando existe un periodo de tiempo entre una lesión y la muerte ya que pueden fungir como

“cápsulas de tiempo”, reflejando las concentraciones de las sustancias contenidas en la sangre varias horas antes de la muerte [33].

Orina.

De igual forma que la sangre, la orina debe tomarse en todas las necropsias con fines toxicológicos. En comparación con la recolección ante-mórtem, para un análisis post-mórtem debe recolectarse toda la orina disponible y no sólo porciones de ella. Si no existiese orina disponible, se debe proporcionar la pared de la vejiga que tendrá en ella los mismos metabolitos que pudiese contener la orina.

Cabello.

Por la información que puede proporcionar un análisis toxicológico en el cabello para exposiciones y consumos crónicos, ésta matriz debe recolectarse en todas las investigaciones post-mórtem que se realicen. A diferencia de la sangre y orina, el muestreo post-mórtem de cabello no difiere del muestreo ante-mórtem ya que la región de muestreo y el tipo de matriz no se ve modificada aún con lapsos relativamente largos de tiempo, esto es, en periodos que no son superiores a tres o cuatro meses después del deceso del sujeto.

Bilis.

¿Qué es?

La bilis es una solución isotónica con un pH entre 6.5 y 7.5 de apariencia verdosa producida en el hígado que es sintetizada y secretada del hepatocito a los canalículos biliares que drenan al conducto hepático común. A partir de aquí, la secreción puede verterse directamente al intestino a través del colédoco o puede desviarse a través del conducto cístico al interior de la vesícula biliar, donde permanecerá almacenada hasta su posterior uso. Comúnmente se generan en promedio cerca de 0.5 a 1 litro de bilis por día que es empleado principalmente en funciones digestivas y excretoras [34].

¿Cuál es su composición?

Está compuesto por agua, sales biliares, sales inorgánicas, fosfolípidos, colesterol, pigmentos biliares (bilirrubina) e IgA. Las sales biliares son ácidos biliares iónicos con cationes de sodio y potasio como contra ion. Los ácidos biliares más importantes son el ácido cólico y el quenodeoxicólico que se sintetizan en el hígado y se secretan como sus conjugados con glicina o taurina en el intestino delgado en donde emulsionan grasas y vitaminas liposolubles. Las principales sales biliares son glicocolato y taurocolato [34][35].

¿Cuál es su función normal en el organismo?

Desarrolla principalmente la función digestiva y degradación de sustancias porque las sales biliares junto con los fosfolípidos son moléculas anfipáticas que facilitan la emulsión de los ácidos grasos de cadena larga y los mono y diacilgliceridos resultantes de la acción de las lipasas intestinales, formando micelas, esto significa que la digestión y absorción de lípidos se debe a que la bilis ayuda a mezclar las grasas de tal forma que cuando las grandes gotas de lípidos procedentes de los alimentos se unen a la bilis forman cúmulos pequeños de tamaño muy inferior accesibles a las enzimas pancreáticas; por lo cual, la ausencia de las sales biliares impide la absorción de las grasas y provoca heces blanquecinas y muchas veces con diarrea.

¿Para qué sirve en el análisis toxicológico?

Como la bilis participa en procesos digestivos o de absorción, puede seleccionarse como una de las matrices de interés forense muy empleada cuando no se dispone de orina para un análisis toxicológico post-mórtem.

La función excretora es aún más importante para el área toxicológica debido a que cuando el hígado, a través del catabolismo de los xenobióticos, degrada sustancias tóxicas para el organismo, los subproductos son excretados hacia la bilis o la sangre, de ahí que los metabolitos biliares entran en el intestino y se

eliminan a través de la materia fecal, mientras que los metabolitos sanguíneos son filtrados por los riñones y se eliminan disueltos en orina [36].

Algunas de las principales sustancias que se eliminan a través de la bilis por las que esta matriz cobra interés toxicológico son los pigmentos biliares (bilirrubina), esteroides (entre ellos el colesterol), metales pesados y algunas sustancias de abuso. Aunado a esto, una concentración muy alta de bilirrubina en la sangre puede provocar ictericia lo que denotaría un mal funcionamiento hepático causado por acción de alguna otra sustancia hepatotóxica detectada en sangre y tal vez no percibida en otros análisis químicos [34].

Aplicaciones.

Esta matriz se ha usado poco en cuanto a la detección de cocaína y/o sus metabolitos.; sin embargo, se considera muy útil, dado que en ella los fármacos, las drogas y sus metabolitos se hallan por lo general a concentraciones superiores a las de la sangre [37]. En más de un tercio de los casos analizados no se detectaron sustancias en la sangre y sí en la bilis. Por eso es útil enviar una muestra de bilis para que su análisis complemente los resultados de los otros restos séricos o matrices biológicas, particularmente cuando han transcurrido varios días después de la administración de cocaína [38].

Ventajas, desventajas y consideraciones importantes.

La ventaja principal de la bilis es que tiene un tiempo de vida mayor al de otras matrices como la orina, además de que al ir perdiendo hidratación forma lodos biliares, e inclusive cálculos biliares que pueden servir para realizar los análisis toxicológicos post-mórtem.

Como se mencionó antes, al ser elegida como matriz sustituta de la orina, la bilis ofrece información sobre el consumo y concentración de sustancias muy similar a la información obtenida de la orina o la pared de la vejiga dando como ventaja a los analistas la posibilidad de contar con una muestra de análisis o testigo en caso de ser necesaria.

Dadas las propiedades de la bilis y sus componentes, presenta la desventaja de necesitar de condiciones específicas de conservación a fin de evitar su fermentación y posible putrefacción que a diferencia de la orina, son más rigurosas.

Además de las condiciones de conservación tan específicas (véase la sección de la bilis del tema 2.2 del presente capítulo), que requiere la bilis, su composición conlleva a que el tratamiento de las muestras sea más prolongado que la preparación y/o extracción de analitos de matrices como la sangre, el cabello o la orina.

Contenido Gástrico (Quimo).

¿Qué es?

El contenido gástrico, también llamado “quimo”, es una mezcla semifluida de consistencia uniforme y pH ácido (3.5-5) con una coloración dependiente del bolo alimenticio ingerido, variando en condiciones normales de incoloro a verdoso por la presencia de las secreciones biliares y en condiciones anormales color marrón o café por la presencia de hemorragias internas o por la presencia de lesiones estomacales.

El quimo se almacena en el estómago hasta alcanzar su capacidad máxima de entre 1.5 a 2.5 litros y posteriormente es dirigido al duodeno para continuar con el proceso de digestión y absorción de nutrientes [39].

¿Cuál es su composición?

En condiciones normales el quimo está compuesto por la mezcla de bolo alimenticio con jugos gástricos, mientras que en ocasiones anormales puede existir la presencia de restos hemáticos que además de cambiar la coloración, también modifican las propiedades del contenido gástrico como el valor de pH del quimo y su degradación en las siguientes etapas digestivas.

A su vez, el bolo alimenticio es la mezcla de saliva con alimentos triturados por la boca y deglutidos. Por su parte, los jugos gástricos (de 2 a 3 litros por día), están compuestos por agua, ácido clorhídrico, factor intrínseco gástrico (proveniente de las células parietales oxínticas), pepsinógeno, renina y lipasa

gástrica, el moco visible (de las células de recubrimiento de superficie) y moco soluble (de las células mucosas del cuello) [25].

La secreción gástrica o jugo gástrico contiene también elementos inorgánicos como algunos iones presentes en la mayoría de las estructuras del cuerpo tales como potasio (K^+), sodio (Na^+), magnesio (Mg^{2+}), fosfato (PO_4^{3-}) y sulfato (SO_4^{2-}).

¿Cuál es su función normal en el organismo?

La función principal del contenido gástrico es almacenar y degradar el bolo alimenticio para que a través de la motilidad gástrica sea reducido a una masa semifluida de consistencia uniforme denominada quimo.

El quimo, que comenzó el proceso de digestión desde la trituración y deglución, es degradado por la acción de la saliva y de los jugos gástricos con el objetivo de convertir las macro moléculas en moléculas de menor tamaño, dando de esta manera la oportunidad al organismo y a las demás estructuras del sistema digestivo a que absorban los nutrientes brindados por la degradación del bolo alimenticio.

La degradación de las macromoléculas y disposición de los nutrientes se da gracias a la composición del jugo gástrico. El factor intrínseco que contiene esta secreción es una glicoproteína que permite la absorción de la vitamina B_{12} mientras que los pepsinógenos son precursores de proteasas que al ser degradados por la acidez del contenido gástrico a pepsinas se encargan a su vez de la degradación de las proteínas ingeridas en el bolo alimenticio a aminoácidos y péptidos.

Durante la digestión gástrica se degradan alrededor del 30 al 40 % de los carbohidratos, del 10 al 20% de las proteínas y menos del 10% de las grasas ingeridas [40].

Así pues el contenido gástrico, a través de la degradación y digestión de las sustancias macromoleculares, pone a disposición los nutrientes que necesita el organismo para su óptimo funcionamiento, dejando al estómago una pequeña proporción de absorción de nutrientes o sustancias muy liposolubles tales como el

alcohol y algunos fármacos como el ácido acetil salicílico, mientras que el resto de las sustancias será absorbida en regiones posteriores del aparato digestivo como lo es el intestino delgado en donde se realiza la mayor absorción gracias a sus extensas superficies y características fisiológicas.

Hay que tener en cuenta que el consumo de ciertas sustancias y el tipo de alimentación modificarán la composición del quimo causando en algunos casos la inhibición de componentes primordiales que se verá reflejado directamente en propiedades del contenido gástrico como lo es el pH y por consiguiente en la degradación y tasa de absorción de nutrientes o xenobióticos.

¿Para qué sirve en el análisis toxicológico?

En la toxicología clínica y la toxicología forense el contenido gástrico es una matriz de interés primordial ya que puede ofrecer información sobre el consumo por vía oral tanto de sustancias de abuso como de posibles sustancias tóxicas para el organismo debido a que es una de las principales vías de absorción de nutrientes y sustancias de interés forense.

Uno de los motivos por los cuales se emplea esta matriz en cualquier análisis toxicológico post-mórtem es que en el contenido gástrico pueden hallarse restos de tabletas, pastillas, cuerpos extraños no digeridos, así como alimentos no degradados que arrojen información sobre la posible causa del deceso, además de que es una matriz que puede emplearse para análisis presuntivos y para análisis de confirmación.

Aplicaciones.

Un ejemplo muy claro del empleo del contenido gástrico como matriz de interés forense son los estudios realizados en casos de presunción de suicidios por ingesta de fármacos o sobredosis por sustancias de abuso a través de la vía oral, ya que al ingerir, en la mayoría de los casos, cantidades exageradas de dichas sustancias en forma de tabletas, cápsulas o comprimidos, cierto número de las mismas quedará con una digestión parcial, que al ser recuperadas del contenido

gástrico pueden permitir su análisis y arrojar información importante sobre el suceso.

De igual forma puede emplearse esta matriz en casos de homicidio por envenenamiento (por vía oral) lo cual, al dar un resultado positivo para el xenobiótico de interés en el contenido gástrico indicará que el individuo consumió la sustancia en algún alimento o bebida dopada previo a su deceso.

Ventajas, desventajas y consideraciones importantes.

El contenido gástrico, al igual que la bilis, presenta una mayor predisposición a la fermentación y/o putrefacción por la naturaleza de sus componentes razón por la cual sus condiciones de almacenamiento y conservación son más rigurosas que las necesarias para conservar matrices como la orina.

Una desventaja más es que no siempre se encuentra contenido gástrico disponible para los análisis correspondientes dado que diversos factores, previos al deceso del individuo, pueden modificar el ritmo del vaciamiento gástrico ocasionando que no exista la cantidad suficiente de quimo en la cavidad estomacal e incluso, dependiendo del suceso, puede no existir la presencia de una ingesta de alimentos previo el suceso de la muerte lo cual implicaría la nula existencia de dicha matriz para los análisis correspondientes.

Realizar una confronta directa entre las sustancias contenidas en esta matriz y las halladas en sangre, ofrece la ventaja no sólo de comparar los resultados entre diferentes matrices, sino que también permite conocer con precisión el xenobiótico causante del posible deceso ya que hay algunas sustancias, por ejemplo las benzodiazepinas, que tienen metabolitos intermedios en común dificultando de esta manera la posibilidad de diferenciar cuál de ellas fue consumida.

En un panorama similar, presenta la ventaja de poder comprobar la ingesta de alguna sustancia o alimento que provocara el deceso o alguna afección a la salud del individuo.

Hígado.

¿Qué es?

Es el órgano glandular más grande del cuerpo humano, pesa 1.5 Kg en promedio, lo que representa entre el 2 y el 5% del peso corporal. Se localiza en el lado derecho de la cavidad abdominal debajo del diafragma, y por encima del estómago, el riñón derecho y los intestinos [41].

Excepto en el área desnuda, está envuelto por peritoneo que forma un recubrimiento de epitelio escamoso simple sobre la cápsula de Glisson que cubre todo menos el hilio.

Recibe aproximadamente 1.5 litros de sangre por minuto de dos fuentes: la arteria hepática (25%) y la vena porta (75%) [25].

¿Cuál es su composición?

Está formado por hepatocitos (aproximadamente el 80% de las células de este órgano), que adoptan una disposición en láminas formando los lobulillos hepáticos hexagonales conectados entre sí por el conducto hepático el cual se encarga de transportar la bilis producida por los hepatocitos hacia la vesícula biliar. Los lobulillos hepáticos, cuya presencia en el hígado se puede cifrar en torno a las 100,000 unidades, son estructuras que resultan de la agrupación de células hepáticas alrededor de una vena central. En cada esquina del lobulillo circulan ramales de la arteria hepática, la vena porta, y los conductos biliares.

Además de los hepatocitos, el hígado contiene también células de Kupffer, que son células fagocitarias especializadas que se encuentran únicamente en dicho órgano. Estas células representan la población más grande de macrófagos de los tejidos y se centran en capturar y atacar parásitos, virus, bacterias y macromoléculas por endocitosis mediada por receptores; por lo tanto, son la barrera contra toxinas y microorganismos. También participan en la eliminación de glóbulos rojos envejecidos y se encargan de la eliminación de las endotoxinas que contiene la sangre portal [25].

Externamente consta de dos lóbulos divididos por el ligamento falciforme; en el centro se sitúan la vena central y los canalículos biliares; en los vértices o áreas portales se sitúan la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar.

La vena porta suministra sangre con nutrientes procedentes del intestino, mientras que la arteria hepática suministra sangre rica en oxígeno, finalmente la sangre sale del hígado a través las venas hepáticas, con productos metabólicos [41].

¿Cuál es su función normal en el organismo?

El hígado regula los niveles sanguíneos de la mayoría de los compuestos químicos por la biotransformación de las sustancias en el órgano. Toda la sangre proveniente del estómago y los intestinos pasa a través del hígado. El hígado procesa esta sangre y descompone los nutrientes y/o xenobióticos en moléculas más fáciles de aprovechar o eliminar por el organismo. Se han identificado más de 500 funciones vitales relacionadas con el metabolismo hepático que en términos generales pueden englobarse en tres categorías: funciones de síntesis, funciones de almacenamiento y funciones de depuración [36] [41].

El hígado interviene en el metabolismo de glúcidos, lípidos (colesterol, triglicéridos) y de las proteínas (albúmina), es un componente esencial en la síntesis de los factores de la coagulación que permiten evitar las hemorragias (protrombina, fibrinógeno, acelerador de globulina) e interviene también en la síntesis y secreción de la bilis hacia el duodeno [25].

Por la parte de almacenamiento, el hígado almacena las vitaminas liposolubles (A, B₁₂, D, K, E) y el glucógeno. De este modo, almacena la energía en forma de glucosa y la pone a disposición del organismo en caso de necesitarla. Almacena también el hierro después de procesar la hemoglobina.

Las funciones de depuración, para el caso particular de estudio, son las funciones de mayor importancia en el hígado ya que endocita y degrada hormonas de las glándulas endocrinas que se llevan a los canalículos biliares para digerirse en el tracto digestivo o a endosomas para su degradación y las oxidasas microsómicas de función mixta inactivan fármacos y toxinas [25].

Sin lugar a dudas el hígado es el principal órgano para la biotransformación de los xenobióticos, pero también puede darse la biotransformación en otros niveles (riñón, plasma, estómago, intestino, pulmón, cerebro, etc.). Cuando la exposición es por vía oral, las sustancias deben pasar primero por la circulación portal, dejando la posibilidad de que el xenobiótico sufra cierto grado de biotransformación antes de pasar a la circulación sistémica, en lo que se conoce como “Efecto de Primer Paso Hepático”; este fenómeno conlleva a una disminución de la biodisponibilidad de la sustancia y forma parte de un conjunto de procesos que se denominan en su conjunto como procesos de eliminación presistémica (la biotransformación intestinal también contribuye a este proceso) [39].

La biotransformación catalítica de los xenobióticos está incorporada en las reacciones de Fase I y Fase II que ocurren principalmente en el hígado con el objetivo de excretar o inactivar (en la mayoría de los casos), las sustancias tóxicas que llegan a él por la circulación sanguínea, así pues, el hígado a través de los sistemas enzimáticos (principalmente citocromo P450 y la conjugación con glutatión), logra biotransformar los xenobióticos liposolubles o no polares, en moléculas polares o hidrofílicas de fácil eliminación.

¿Para qué sirve en el análisis toxicológico?

El hígado es una matriz de selección para estudios toxicológicos en el ámbito forense porque es, como se mostró anteriormente, el principal órgano encargado de la biotransformación de diversos componentes endógenos y exógenos, además de ser susceptible a sufrir daños por el consumo o exposición a ciertas sustancias. Parte de esta susceptibilidad es una consecuencia de la ingesta de sustancias que van directamente al hígado a través de la vena porta, por consiguiente, el xenobiótico alcanza concentraciones relativamente altas en él.

El hecho de que el hígado sea el responsable de biotransformar la mayor cantidad de xenobióticos, a comparación de otros sistemas del organismo, implica que en él exista una cantidad elevada tanto de la sustancia no biotransformada como de sus metabolitos, dejando la posibilidad de hacer una mejor correlación entre ambas determinaciones. Esto le permite al analista conocer no sólo los

metabolitos contenidos en la muestra, sino también el origen de los mismos y discernir de esta manera entre una gama amplia de posibilidades de alguna familia de sustancias, comprobando o denegando exposiciones de tipo aguda o crónica [42].

Aplicaciones.

Algunos xenobióticos de acción lenta, como rodenticidas anticoagulantes, se detectan y se acumulan principalmente en el hígado. Los metales pesados como el plomo también se acumulan en el hígado y el riñón y están bien definidas las concentraciones que se asocian con la intoxicación letal en estos tejidos [30].

Uno de los ejemplos más claros en los que se emplea el hígado como matriz de análisis son las muertes ocasionadas por congestiones alcohólicas, debido a que, el 98% del etanol absorbido se biotransforma en el hígado, con una velocidad de 10 ml/hora, utilizando para ello tres vías metabólicas: vía de la enzima alcohol deshidrogenasa, vía del sistema microsomal de oxidación (MEOS) y vía de las catalasas. La biotransformación del etanol presenta diferencias entre individuos, de acuerdo a sus características enzimáticas, ya que existen metabolizadores rápidos y lentos, lo que va a incidir directamente en su velocidad de biotransformación, pero dada la acumulación de alcohol y sus metabolitos en el hígado, esta matriz presentará una alta concentración de analitos disponibles [43].

Otro ejemplo representativo es el análisis requerido por el consumo presuntivo de THC ya que los metabolitos de THC tienen un elevado periodo de eliminación debido a la alta liposolubilidad de estos compuestos y por su elevado volumen de distribución. Se ha calculado que al cabo de una semana se ha excretado un 50-70% de la sustancia absorbida, sin embargo, el THC y sus metabolitos se concentran en los tejidos con alto contenido lipídico, como el tejido adiposo, pulmones, riñones, hígado, corazón, bazo y glándula mamaria, que se comportan como reservorios y justifican la elevada duración de estos compuestos en el órgano y por ende, el empleo del hígado como una de las matrices de elección para análisis post-mórtem en la búsqueda de esta sustancia [44].

Ventajas, desventajas y consideraciones importantes.

La ventaja más plausible que presenta elegir esta muestra es que gracias a que en el hígado se llevan a cabo la mayoría de los procesos de biotransformación, las concentraciones tanto de los xenobióticos como de sus metabolitos serán más elevadas que en otras matrices. Gracias a lo anterior, presenta también la ventaja de contar con datos de interpretación para muchas sustancias y sus metabolitos según la concentración encontrada en la muestra.

Otra ventaja es el poder evaluar la relación de concentraciones de las sustancias entre el hígado y la sangre para poder diferenciar entre una exposición crónica y una aguda.

Por otro lado, debido a la complejidad de la matriz, requiere de un tratamiento complejo previo al análisis presuntivo o confirmatorio, por ejemplo, digestiones con ácidos minerales fuertes o de equipamiento para su centrifugación.

Uñas.

¿Qué es?

Son estructuras anexas de la piel en forma de placas córneas y duras situadas en la cara dorsal de las falanges terminales de manos y pies. La superficie de la piel cubierta por ellas se llama lecho ungueal. La uña está rodeada lateral y proximalmente por un pliegue de piel, llamado rodete ungueal. El espacio que existe entre el rodete y el lecho se llama surco ungueal. El borde proximal de la placa ungueal se denomina como raíz. La uña es semitransparente y permite que el color del tejido subyacente, rico en vasos sanguíneos, se muestre a través de ella. Cerca de la raíz, la uña tiene un color blanquecino, esta porción en forma de media luna, denominada lúnula, está cubierta por la porción proximal del pliegue ungueal [45].

¿Cuál es su composición?

Está compuesta por una matriz compleja de proteínas de crecimiento laminar y por elementos iónicos muy variados. Existen reportes [46] donde se demuestra la presencia de una gran variedad de metales y elementos inorgánicos

dentro de su estructura, sin embargo, la queratina y las células epidérmicas muertas son los componentes mayoritarios, con una abundancia de 79% y 10% respectivamente, dejando a los demás elementos a nivel de trazas dada la gran cantidad de elementos contenidos. La composición final de la uña suele cambiar sustancialmente en función del cambio de hábitos alimenticios y otros factores epigenéticos debido a que su formación depende de los elementos contenidos en el torrente sanguíneo y que tan variados o estables sean estos factores, la composición de la uña se modificará aún en el mismo individuo y en periodos de tiempo no establecidos [45].

Debido a que la composición de las uñas depende principalmente de los nutrientes contenidos en la sangre, su composición se verá sustancialmente afectada por alguna alteración sistémica por falta o exceso en la concentración de alguno de los solutos integrados en la matriz, así pues, algunas sustancias de abuso llevarán a desplazamientos de sustancias dentro de la matriz de las uñas, algunos ejemplos se presentarán más adelante.

En la actualidad, se sabe que la composición de las uñas se ve severamente afectada por la edad, el género, el consumo de sustancias de abuso, tabaquismo, ciertas patologías podológicas, desórdenes genéticos, exposición a tóxicos de distinta naturaleza, entre otros.

¿Cuál es su función normal en el organismo?

Al igual que para el cabello, esta sección se centrará más en las características fisiológicas de las uñas y no en las funciones sistémicas ya que no representan una complejidad más allá de la protección de la zona ungueal de los dedos, y en menor medida, una ruta minoritaria de excreción de xenobióticos o sus metabolitos.

El ritmo de crecimiento de la uña es aproximadamente de 0.1 milímetros por día con tasas de hasta 4 milímetros al mes. Así pues, un segmento de crecimiento recién formado en la raíz de la uña tarda aproximadamente de dos a tres meses para llegar a la región libre donde puede ser fácilmente muestreada a través de un corte. Tarda aproximadamente de seis a ocho meses en volver a crecer en su

totalidad y el ritmo de crecimiento de las uñas en los miembros superiores es cuatro veces más acelerada que la de los miembros inferiores [45].

La matriz de la uña está formada casi en su totalidad de queratina y células muertas agrupadas en capas que muchos autores llaman de “plástico biológico”. La queratina está compuesta por el aminoácido principal cisteína y otros 17 aminoácidos de menor aporte a su estructura. La uña comienza a sintetizarse a partir de la formación de un enlace disulfuro entre dos moléculas de cisteína para adoptar una estructura tridimensional en forma de α - hélice que presenta una gran resistencia mecánica y química que además le proporcionan un carácter hidrofóbico, limitando de esta manera las interacciones entre su estructura y los medios acuosos. De esta forma, los nutrientes y xenobióticos hidrofóbicos que circulan a través del torrente sanguíneo se incorporan a la matriz de la uña por su carácter no polar [45].

Muchos xenobióticos y sus metabolitos son incorporados a la estructura principal de las uñas ya que la selenoproteína glutatión peroxidasa, que es una enzima esencial del sistema antioxidante que protege al cuerpo contra los efectos de especies reactivas de oxígeno, a través de la reacción con los peróxidos endógenos convierte glutatión (GSH) en glutatión disulfuro (GSSG) mostrando de esta forma dos rutas de incorporación a las uñas. La primer ruta es a través de la incorporación por sus puentes disulfuro a la matriz de la uña rica en enlaces del mismo tipo, mientras que la segunda ruta es a través de la conjugación del glutatión con grupos reactivos o electrófilos generalmente asociados a los mecanismos de resistencia a tóxicos. Así pues, algunos estudios han demostrado la presencia de sustancias de abuso, metales pesados y algunos plaguicidas en las uñas a través de estudios clínicos de rutina en ámbitos laborales y jurídicos [45].

¿Para qué sirve en el análisis toxicológico?

La información brindada por la estructura de las uñas no sólo sirve para conocer o monitorear la salud de las personas por medio de análisis clínicos, sino

que también puede emplearse en la toxicología forense para demostrar la exposición o consumo de una gran variedad de sustancias.

Dado las características fisiológicas de esta matriz, similar al cabello, ofrece una ventana de tiempo muy amplia en cuanto a estudios de temporalidad se refiere ya que su ciclo total de regeneración es de varios meses, tiempo en el cual los xenobióticos y sus metabolitos se incorporan a su estructura y se almacenan en ella aún a pesar de tratamientos estéticos o de condiciones mecánicas severas.

El empleo de dicha matriz biológica se remonta a los años setenta [45] en los que se demostró la relación entre la concentración de selenio en las uñas con la eficiencia de los agentes antioxidantes del organismo y a su vez, su relación con patologías como el cáncer y problemas cardiovasculares. Posteriormente, en los años ochenta [47] se comprobó la presencia de diferentes sustancias de interés forense y se comprobó su empleo como matriz de análisis en casos en los que era necesario aproximar la temporalidad del consumo, principalmente ante exposiciones crónicas.

Estudios recientes de Arwa et al. [48] y Fernández-Rodríguez et al. [49], demuestran también la posibilidad de emplear las uñas o parte de ellas para análisis de ADN, tanto para el reconocimiento de víctimas e individuos desconocidos, como para el reconocimiento de agresores tras un evento en el que se encuentran restos hemáticos o epidérmicos incrustados en las uñas de la víctima.

Aplicaciones.

En un estudio realizado en 1989, se comprobó la presencia de metanfetamina en diferentes matrices provenientes de consumidores crónicos en periodo de detoxificación, entre estas matrices se contempla al recorte de las uñas de dichos individuos de los cuales, 13 muestras resultaron positivas de las 20 muestras analizadas [47].

Al ser una matriz química y mecánicamente resistente, el uso de las uñas en estudios de rutina para ambientes laborales ha cobrado gran aceptación y empleo ya que en ella no sólo se puede detectar el uso crónico de sustancias de abuso

como la marihuana (1- Δ^9 -THC), sino también los niveles sistémicos de sustancias como plaguicidas, siendo los organofosforados los de mayor monitoreo por exposiciones laborales controladas; además de metales como el plomo, arsénico, mercurio, vanadio, cromo, cobre, etc., que son depositados en la matriz por el contacto continuo con hidrocarburos y esmaltes, entre otros materiales como baterías y desechos industriales [45].

Ventajas, desventajas y consideraciones importantes.

La primera ventaja que resulta del estudio de esta matriz es que el proceso de muestreo es mínimamente invasivo (en los casos ante-mórtem), dando la oportunidad al analista de recolectar las muestras sin la necesidad de contar con las condiciones de privacidad y sanitarias mínimas que requeriría el muestreo de otras matrices como la sangre y la orina.

Presentan también la cualidad de ser mecánica y químicamente estables lo que garantiza su preservación por tiempos prolongados sin la necesidad de ser refrigerados o conservados con alguna sustancia como el fluoruro de sodio, EDTA, etc.

Su estabilidad permite que al no requerir condiciones especiales de conservación se presente una ventana de análisis similar a la del cabello (alrededor de 4 o 6 meses) y la adulteración de las muestras sea prácticamente imposible ya que los analitos de interés están embebidos en la matriz de la uña por lo que no pueden ser adicionadas o removidas sustancias de interés analítico. Esto da como ventaja adicional que cualquier intento de adulteración sea eliminado a través de los lavados a los que son sometidas las muestras.

La desventaja más importante en el análisis de uñas o porciones de ellas es que las concentraciones de las sustancias que pueden estar presentes en su estructura son sumamente inferiores a las concentraciones que presentan matrices como la sangre y la orina. Estas concentraciones bajas, sumadas a la complejidad en la extracción de las sustancias, impiden que se tengan análisis presuntivos tan variados como los disponibles para la orina, por ejemplo.

Otra desventaja en los análisis toxicológicos de uñas es que, dado su metabolismo de síntesis, el empleo de una porción de la uña (por ejemplo el último corte), no necesariamente será una muestra representativa de toda la matriz ya que su composición no es homogénea y está determinada por los hábitos del sujeto, en otras palabras, la interrupción de la exposición o consumo crónico de alguna sustancia modificará la composición de la matriz a través de su superficie mostrando zonas en las que existan concentraciones distintas de los elementos contenidos en la uña e incluso zonas en las que alguna de estas sustancias no exista siquiera a nivel de trazas.

Un estudio realizado en el año 2009 por Ali et al. [50], detectó a través de microscopía de Raman confocal los restos de la contaminación ocasionada por el manejo manual, transporte y uso de explosivos. Esta metodología está siendo probada en estudios posteriores para su aplicación en el área toxicológica, toda vez que una gran variedad de sustancias de abuso se consumen empleando las uñas como dosificadores, obteniendo como resultado de esta práctica, la deposición de cierto número de partículas de las sustancias inhaladas, dejando la clara desventaja de presentar contaminación externa difícil de diferenciar entre una contaminación circunstancial o una contaminación con fines de modificar los resultados analíticos.

Otros órganos o fluidos.

Como se mencionó con anterioridad, el muestreo de cualquier matriz biológica post-mórtem puede ser factible si se justifica su empleo dentro del proceso jurídico que se esté llevando a cabo. Los análisis que se realicen para la identificación y cuantificación de las respectivas sustancias serán determinados por el analista, quien valiéndose de su experticia y de una adecuada gestión de la información disponible decidirá, con base en las características, objetivos e hipótesis del caso, qué matriz tomará en cuenta para la resolución de paradigma particular centrándose principalmente en las características propias de la muestra y de la sustancia que se desee encontrar.

Ejercicio Práctico 1.

Lee cuidadosamente el caso que te proporcionó el profesor y resuelve el siguiente cuestionario en tu bitácora:

1. ¿Qué sustancia o sustancias están relacionadas con el caso?
2. ¿Cuáles son los síntomas que llevaron a sospechar de la o las sustancias relacionadas con el caso?
3. ¿Qué propiedades fisicoquímicas tienen (liposolubilidad, pka y estabilidad)?
4. ¿Cuál es la posible ruta de exposición?
5. ¿Cómo se distribuye, biotransforma y elimina?
6. ¿Qué mecanismo de acción presenta?
7. ¿Es posible detectar un marcador biológico de exposición a dicha sustancia?
8. ¿Qué muestras biológicas recolectarías para aportar información al caso?
Justifica tu respuesta.

2. Recolección, embalaje, transporte y almacenamiento de muestras.

En esta sección se describen los procesos para llevar a cabo la recolección de muestras tomando en cuenta las matrices de mayor empleo que son orina, sangre, cabello, contenido gástrico o algún órgano (en su totalidad o parte de él). Dentro de esta unidad también se describe la forma adecuada de realizar el embalaje, según el tipo de matriz, para asegurar una buena conservación y para impedir que dicha muestra sea alterada cambiando los resultados que pudieran arrojar los análisis.

Esta unidad también contempla el embalaje y las condiciones óptimas de transporte o almacenamiento de las muestras que aseguran un cambio mínimo en las propiedades tanto de la misma matriz como de las sustancias que se pretende identificar y, en su caso, cuantificar para que el dictamen al que se llegue sea veraz.

Los análisis toxicológicos aplicados en el área forense constituyen una parte sumamente relevante en la investigación de un suceso sujeto a una investigación jurídica, por lo que debe cumplir con un elevado criterio de calidad, considerando disponibilidad, confiabilidad, especificidad y sensibilidad del método seleccionado.

La obtención de la muestra constituye el primer eslabón de ese proceso y es el que condicionará las etapas siguientes del análisis hasta llegar al resultado final, por lo que establecer pautas claras en esta **etapa crítica** es fundamental [51].

La confiabilidad y exactitud de cualquier resultado toxicológico es usualmente determinado por la naturaleza y la integridad del espécimen a analizar. Además, la selección de los especímenes apropiados y su recolección son de inmensa importancia para que los resultados analíticos sean correctamente interpretados con validez científica, particularmente cuando los resultados serán empleados en el sistema judicial [52].

2.1. Recolección ante-mórtem.

Los análisis toxicológicos sistemáticos de especímenes provenientes de individuos ante-mórtem se requieren típicamente en crímenes facilitados por sustancias de abuso e intentos de envenenamiento. La limitación en la variedad de matrices disponibles de los sujetos representa un reto toxicológico cuando se intenta identificar y cuantificar xenobióticos desconocidos en el organismo del sujeto. En todos los casos de análisis toxicológico, las muestras deben recolectarse lo antes posible y deben etiquetarse con la información necesaria para su identificación (Nombre completo del sujeto, fecha y hora de la recolección, y las iniciales de quien tomó la muestra).

Los mejores recipientes para la recolección de líquidos son los recipientes de plástico duro, estériles y desechables; de lo contrario, tubos de vidrio estériles son suficientes para realizar el muestreo.

Cuando es necesario agregar un conservador a la muestra, el fluoruro de sodio a una concentración de 2% (m/v) es la mejor opción (siempre y cuando los análisis no estén enfocados a sustancias que contengan flúor). La mayoría de las muestras, salvo indicaciones especiales, deben conservarse en refrigeración a no más de 4 °C para asegurar la integridad de la muestra, a menos que tengan que ser preservadas por periodos largos de tiempo, situación en la que deberán permanecer a -20 °C hasta su empleo en el análisis.

Para los casos ante-mórtem se consideran principalmente cuatro matrices:

- Sangre.
- Orina.
- Cabello.
- Otro fluido sérico (saliva).

De acuerdo al objetivo del análisis pueden elegirse otras matrices que no interfieran con la salud del individuo tales como el aire exhalado para la búsqueda de tóxicos volátiles (cuando sea factible, ejemplo: prueba del aliento o alcoholímetro), mucosa

nasal para inhalación de sustancias, sudor, materia fecal, uñas en el caso de querer establecer una temporalidad, etc. La elección de las matrices quedará sujeta a la decisión de quien las analice y a los medios disponibles con que se cuente en ese momento. Actualmente la ley establece que si el individuo se encuentra relacionado a un proceso legal debe haber un consentimiento informado y la muestra debe tomarse en presencia de su representante legal, asimismo la ley establece que tipo de muestras biológicas requieren de orden judicial.

Sangre.

Para la toma de muestra es necesario desinfectar la piel con iodopovidona, solución jabonosa o agua oxigenada, nunca con alcohol etílico u algún otro antiséptico que lo contenga para evitar introducir interferencias en los análisis posteriores y se realizará la extracción de la sangre por medio de una extracción endovenosa, usando agujas y jeringas estériles (puede emplearse también tubos cerrados al vacío como los Vacutainer®, siempre y cuando el material se encuentre en condiciones estériles).

Ante la sospecha de una intoxicación de origen desconocido, se deberá recoger la muestra de sangre en dos tubos Vacutainer®, uno de ellos con anticoagulante (preferentemente heparina o K₂EDTA), y otro sin anticoagulante (o con gel acelerador de coagulación).

En el caso de tener que asegurar la estabilidad de la muestra, se recomienda reemplazar la heparina por fluoruro de sodio al 2% (m/v), como preservador bacteriano.

El volumen recomendable en cada tubo será de 5 mL para contar con un mínimo de 10 mL de sangre por cada análisis toxicológico. Cuando sea necesario, deberá obtenerse un tercer tubo de 5mL con K₂EDTA para resguardarse como muestra testigo [52].

Los recipientes que se envían deben ser tubos de polipropileno o un polímero similar con cierre hermético, y es necesario utilizar materiales estériles para evitar la contaminación y posibles interferencias residuales de otras sustancias.

Así, mismo, es importante cerciorarse que no quede espacio vacío en el recipiente contenedor cuando se trata de sangre o suero donde se buscarán xenobióticos volátiles, es decir, se debe evitar la formación de una cámara de aire, que produce pérdidas considerables no sólo de etanol, cianuro, monóxido de carbono, sino de cualquier tóxico volátil como el caso de los VOC's (por sus siglas en inglés volatile organic compounds). Para evitar esto, el recipiente debe llenarse en su totalidad, bien tapado y de ser posible, sellado.

Los recipientes que serán utilizados para colocar sangre o suero no deben enjuagarse nunca con alcohol ya que desproteíniza la muestra y esto podría alterar los resultados analíticos [51].

Orina.

Este tipo de muestra es idónea para realizar un estudio de cernimiento o “*screening*” en el caso de no conocer el origen de la intoxicación ya que la concentración del analito suele ser mayor que en la sangre. Además la orina, en general, está exenta de proteínas, con lo cual se tiene menos interferencias. Es una muestra abundante, fácil de recolectar y también de conservar.

Para su recolección es necesario un recipiente estéril de polipropileno de boca ancha y con tapa de rosca con capacidad mínima de 30 mL. De no contar con un recipiente de tal volumen pueden emplearse varios recipientes de polipropileno estériles hasta conseguir un volumen aditivo de 30 mL (todos los recipientes deberán estar correctamente etiquetados para su identificación).

De ser posible, o si el caso lo requiere, es conveniente recolectar el volumen total de 24 horas, pero de no ser posible, las orinas ocasionales también son útiles en los análisis toxicológicos (esto es necesario consultarlo con el laboratorio o centro de análisis especializado).

Se debe conservar en refrigeración según lo indicado para muestras biológicas, tras la adición de fluoruro de sodio al 2% [51].

Cabello.

Este espécimen se selecciona cuando ha transcurrido un tiempo considerable desde la exposición a la sustancia de interés y el análisis toxicológico.

Se debe recolectar aproximadamente de 100 a 200 mg de cabello de la región occipital, cortando lo más cercano posible al cuero cabelludo asegurándose de indicar qué extremo del cabello es la más cercana al cuero cabelludo asegurando la muestra en un mechón con bandas elásticas limpias. Posteriormente, se coloca la muestra de cabello en una hoja de papel aluminio de tamaño adecuado y se envuelve para después embalarse en una bolsa estéril o en un tubo de plástico estéril [52].

Otros fluidos séricos.

Para la recolección de otros fluidos séricos del sujeto, por ejemplo saliva, sudor, etc., es necesario emplear hisopos (con cartucho autosellable) de dacrón o de alginato de calcio (jamás de algodón porque pueden dejar fibras en la muestra que generarían interferencias en los análisis), para recolectar la mayor cantidad posible de dicho fluido. Para el caso de la saliva, se realiza un raspado en la mucosa bucal, al igual que sobre la superficie de la lengua y debajo de ella. También pueden emplearse soluciones salinas para realizar un enjuague de la boca y se recolecta dicho enjuague en un recipiente estéril de polipropileno de boca ancha y tapa de rosca. Una vez realizado el raspado en la mucosa bucal, el hisopo se introduce en su cartucho, sellado y posteriormente en una bolsa de plástico estéril.

2.2. Recolección post-mórtem.

Más que en cualquier otra investigación, los casos de muertes misteriosas o repentinas, requieren de la aplicación de análisis toxicológicos forenses extensivos. La disposición de más matrices a través de la necropsia, le permiten al toxicólogo contar con una mayor flexibilidad debido a que algunas muestras tienen mayores

implicaciones que otras cuando se habla de xenobióticos específicos involucrados en la causa de muerte.

Por otro lado, es de vital importancia notar que la autólisis y la putrefacción, procesos que ocurren después de la muerte, al igual que la redistribución post-mórtem, pueden cambiar la concentración de las sustancias de abuso o toxinas presentes en el organismo ante-mórtem.

Por estas razones, los especímenes post-mórtem deben recolectarse lo antes posible y en contenedores separados. Para la mayoría de las muestras, los recipientes desechables de polipropileno o tubos de vidrio son los más recomendados. Todas las muestras deben etiquetarse adecuadamente.

Al igual que las muestras ante-mórtem, los especímenes post-mórtem deben almacenarse bajo refrigeración. Cuando alguna muestra líquida sea congelada, es recomendable dejarle un espacio de entre 10 y 20% de aire dentro del recipiente [52].

En los casos post-mórtem se consideran principalmente las siguientes matrices:

- Sangre.
- Orina.
- Cabello y uñas (matrices queratinizadas)
- Contenido gástrico.
- Bilis.
- Hígado (órganos y viseras).

Sangre.

Siempre que sea posible se deben tomar dos muestras. La primer muestra de 30 mL de sangre central (de la cámara superior derecha del corazón, vena cava, o alguna otra arteria principal) para análisis cualitativos. La segunda muestra de 10 mL de sangre periférica (preferentemente de las venas femorales derecha o izquierda), para análisis cuantitativo; ambas muestras a través del acceso vascular directo previo al acceso de la cavidad abdominal. Ambas muestras deben

conservarse con fluoruro de sodio y oxalato de potasio, a menos de que exista la sospecha de una intoxicación con fluoruro o algún componente halogenado [52].

Orina.

Es necesario remitir toda la muestra existente en la vejiga, en forma similar a la recolección sanguínea, extrayendo el contenido de la vejiga con el empleo de jeringas y agujas estériles, colocándola en recipientes de mayor capacidad. No es necesario agregar ningún conservador y se debe mantener en refrigeración a las mismas condiciones que la orina ante-mórtem [51].

Cabello y uñas.

Estas matrices permiten el análisis después de días, semanas o meses de su recolección. Para el cabello el método de muestreo no se ve modificado en el estadio post-mórtem. Por su parte, las uñas deben removerse en su totalidad, tanto de los dedos de las manos, como de los pies con el empleo de pinzas quirúrgicas y bisturí. Son embaladas en forma similar al cabello, primero en láminas de aluminio y posteriormente en bolsas de plástico estériles y selladas [52].

Contenido gástrico.

Toda la cantidad disponible de contenido gástrico debe recolectarse sin la adición de conservadores en recipientes de polipropileno estériles con boca ancha y tapa de rosca o de sello hermético. La recolección puede realizarse a través de una pipeta de plástico larga y nueva. Las píldoras, tabletas, pastillas o cuerpos extraños no digeridos deben ser separados y depositados, primero en cajas plásticas de pastillas y posteriormente, en bolsas plásticas estériles para su análisis químico [52].

Bilis.

Es recolectada en casos post-mórtem en los que no se tiene orina disponible para los análisis toxicológicos. Debe removerse toda la bilis disponible de la vesícula biliar y conservarse con fluoruro de sodio 2% (m/v). A diferencia del

tratamiento general para otras muestras, ésta requiere, para evitar la fermentación, refrigerarse y almacenarse a una temperatura de -20 °C [52].

Hígado (otros órganos y viseras).

El hígado y los demás órganos o vísceras deben colocarse en recipientes estériles (limpios y nuevos) sin agregar ninguna sustancia como conservador. Es importante disponer de un recipiente independiente para cada órgano. Los recipientes pueden ser de vidrio preferentemente ámbar para evitar la degradación de sustancias fotosensibles y el tamaño debe ser proporcional al tamaño de la muestra, evitando en lo posible la existencia de cámaras de aire. Los recipientes deben tener un cierre hermético y no deben usarse tapas de papel, algodón o cartón.

Si no se cuenta con recipientes de vidrio, pueden emplearse recipientes plásticos estériles que permitan un cierre perfecto.

Las muestras deben conservarse a -20 °C debido a que la actividad enzimática en los sistemas biológicos se halla prácticamente paralizada en esas condiciones.

En el caso de sospecha de tóxicos volátiles se debe extremar los cuidados en cuanto a la cadena de frío hasta la recepción de las muestras en el laboratorio de destino [51].

En el caso particular del hígado, para minimizar los efectos de difusión del intestino delgado y del estómago en los análisis cuantitativos, la muestra debe tomarse de la parte profunda del lóbulo derecho del hígado en una cantidad aproximada de entre 25 y 50 g [52].

2.3. Embalaje de muestras.

Según la Procuraduría General de la República (PGR), en las Disposiciones Preliminares del Capítulo I, del acuerdo A/009/15, emitido el día 12 de febrero de 2015 en el Diario Oficial de la Federación [53], el embalaje es el *“conjunto de materiales que envuelven, soportan y protegen al indicio o elemento material*

probatorio con la finalidad de identificarlos, garantizar su mismidad y reconocer el acceso no autorizado durante su traslado y almacenamiento. El embalaje constituye un refuerzo del empaque y, en algunos casos, podrá fungir como empaque del indicio o elemento material probatorio”.

Así pues, en el embalaje deberán colocarse los indicios o elementos materiales probatorios en bolsas, envases, cajas u otro contenedor nuevo de acuerdo con su tipo considerando las condiciones especiales que sean necesarias para garantizar su integridad física durante el traslado. Asimismo, **deberá realizarse de manera individual**, salvo cuando estos puedan ser agrupados de acuerdo con su tipo, y siempre que esta actividad no cause pérdida, daño, alteración o contaminación de los indicios o elementos materiales probatorios [53].

Según indica Locani et al. [51], es recomendable distinguir entre tres tipos de recipientes con la finalidad de optimizar la conservación de las muestras por el embalaje. El **Recipiente primario** es el que contiene el material a transportar. Puede ser de polipropileno cerrado herméticamente a fin de evitar pérdidas. En el caso de ser de vidrio deberán tomarse todas las medidas necesarias que prevengan posibles rupturas o agrietamientos que permitan derrames del indicio o elemento material probatorio. Todos los componentes del contenedor deberán estar estériles y libres de sustancias que puedan interferir con el test de laboratorio y su resultado.

El **Recipiente secundario** deberá ser de material rígido y aislante, tipo tergopol, el cual contendrá hielo seco o cápsulas refrigerantes. En el mismo se acondicionarán los envases primarios de forma tal que se evite su deterioro en el transporte. De no disponer de otro material o elemento refrigerante que no sea hielo, se deberá acondicionar el hielo de manera que al derretirse, el agua no ingrese a los envases primarios, o que estos últimos no queden flotando y puedan romperse o derramarse, asegurando siempre que la temperatura de traslado se mantenga a menos de 4 °C, máximo 8 °C.

El **Empaque final** será preferentemente, una bolsa plástica adherida al recipiente secundario en la cual se adjuntará la documentación pertinente de cadena de custodia (ver Unidad 3, subtema 3.1. Cadena de Custodia), cerrada y

fijada de forma tal que no sufra deterioro alguno [51]. Este empaque final en el acuerdo A/009/15 se le llama Embalaje. El embalaje constituye un refuerzo del empaque y, en algunos casos, podrá fungir como empaque del indicio o elemento material probatorio.

Dicho embalaje deberá sellarse y etiquetarse con la finalidad de enviarlo a los servicios periciales, a las bodegas de indicios o en su caso, a algún otro lugar, en condiciones de preservación o conservación.

Para sellar el embalaje se deberán utilizar cintas de seguridad, medios térmicos o cualquier otro medio con el fin de reconocer accesos no autorizados. Cuando se empleen cintas de seguridad deberá cruzarse la firma en la cinta y en el embalaje.

Por su parte el etiquetado se realizará para identificar los indicios o elementos materiales probatorios una vez que han sido embalados, por lo menos, con los siguientes datos (Figura 3):

- Número de carpeta de investigación.
- Número de Folio o equivalente.
- Fecha y hora de la recolección.
- Tipo de indicio o elemento material probatorio.
- Identificación del indicio.

INDICIO/ ELEMENTO MATERIAL PROBATORIO	
Carpeta de Investigación: _____	
Folio: _____	
Fecha: _____	Hora: _____
Tipo de indicio/elemento material probatorio/ _____ _____	Identificación (Número, letra o combinación)

Figura 3. Formato de etiquetas para embalaje de indicios. Anexo 5 del Acuerdo A/009/15[53].

Es importante que antes de proceder al traslado se realice un inventario y la emisión de las recomendaciones correspondientes para su transporte. El inventario es, en forma descriptiva, contabilizar y asegurar que los indicios y/o elementos materiales probatorios recolectados estén documentados en el “Registro de Cadena de Custodia” (Anexo 3 del Acuerdo A/009/15 de la PGR), y en el “Formato de entrega-recepción de indicios o elementos materiales probatorios” (Anexo 4 del Acuerdo A/009/15 de la PGR).

Las recomendaciones por su parte corresponden a la emisión de las indicaciones para el manejo y traslado de los indicios o elementos materiales probatorios con el fin de garantizar la integridad de los mismos (Anexo 3 del Acuerdo A/009/15 de la PGR), las cuales debe contemplar:

- Condiciones de traslado (destino-origen).
- Condiciones ambientales.
- Tipo de indicio o elemento material probatorio.
- Tiempo para iniciar el traslado (mínimo).
- Tiempo de transporte para el traslado.
- Indicaciones o etiquetas que refieren el contenido y la forma en que el paquete debe transportarse (frágil, líquido, tóxico, posición, en su caso).
-

2.4. Traslado y almacenamiento de muestras.

Traslado.

El traslado es la actividad, realizada por el Policía Federal Ministerial, que tiene como finalidad transportar los indicios o elementos materiales probatorios debidamente embalados, del lugar de intervención hacia los servicios periciales, a la bodega de indicios o en su caso, a algún otro lugar en condiciones de preservación o conservación en cumplimiento a las recomendaciones de los especialistas.

Inicia cuando el Policía Federal de Investigación encargado del traslado recibe los indicios o elementos materiales probatorios y finaliza con su entrega en los servicios periciales para los estudios correspondientes, en la bodega o en su caso, a algún otro lugar en condiciones de preservación o conservación de indicios para su almacenamiento.

Se realizará una entrega para **almacenamiento transitorio** cuando por causas de fuerza mayor o recomendaciones logísticas no puedan trasladarse los indicios o elementos materiales probatorios a la brevedad hacia los servicios periciales, estos deberán ser canalizados a las bodegas de indicios para su almacenamiento o en su caso, a algún otro lugar en condiciones de preservación o conservación hasta su posterior disposición a las instancias pertinentes.

Tan pronto como cesen las causas que ocasionaron el impedimento de traslado y se reúnan las condiciones logísticas necesarias para realizarlo con seguridad, éste deberá efectuarse inmediatamente para practicar los análisis correspondientes en los servicios periciales.

Todo indicio o elemento material probatorio se entregará embalado sellado, etiquetado y con el "Registro de Cadena de Custodia" (Anexo 3 del Acuerdo A/009/15).

El **traslado a la sala de audiencia** es un caso particular de traslado ya que se realiza al concluir la etapa de análisis de los indicios o elementos materiales probatorios y su posterior almacenamiento en la bodega de indicios. Es realizado por el servidor público que recibe los indicios en la bodega, el Ministerio Público de la Federación y la Policía Federal Ministerial. Así pues, el traslado a la sala de audiencia se define como la actividad que se realiza con el fin de presentar indicios o elementos materiales probatorios ante el órgano jurisdiccional, en caso de ser procedente.

Este proceso inicia con la salida de los indicios o elementos materiales probatorios de la bodega de indicios, incluye el traslado, su incorporación en la audiencia, su reingreso a la bodega de indicios y finaliza con la determinación judicial.

Almacenamiento.

El almacenamiento es el conjunto de actividades necesarias para depositar los indicios o elementos materiales probatorios en lugares adecuados que garanticen su conservación hasta que la autoridad determine su destino.

Inicia cuando el responsable de la recepción de los indicios en la bodega recibe estos o los elementos materiales probatorios y finaliza con la salida definitiva de la bodega.

Para asegurar que el almacenamiento cumpla con los requerimientos y condiciones de conservación es preciso que en todo momento se controle el registro de primer ingreso, salidas temporales y la salida definitiva a través de su correspondiente “Registro de Cadena de Custodia” (Anexo 3 del Acuerdo A/009/15 de la PGR), comprobando que los indicios o elementos materiales probatorios estén bajo las condiciones de preservación o conservación indicadas en el documento antes mencionado, además de cerciorarse de que al realizar salidas temporales las condiciones de embalaje y traslado sean las óptimas para evitar deterioro alguno.

Es de suma importancia notar que los encargados del almacenamiento deberán estar bien instruidos en el manejo de cada indicio, no sólo para su manipulación, sino para la elección de los sitios de resguardo ya que dadas las múltiples características de las muestras, existen incompatibilidades entre grupos de sustancias que podrían inducir el deterioro de los indicios o elementos materiales probatorios.

De la misma forma en que el personal debe contar con la instrucción necesaria para el desempeño de su labor, no cualquier inmueble puede emplearse como bodega, sino que las bodegas o sitios de almacenamiento deben contar con áreas específicas para el almacenaje y reconocimiento de los indicios, así como contar con las condiciones de higiene y las instalaciones mínimas necesarias para garantizar la preservación o conservación de todo lo que en ellas se resguarde, esto es, debe contar con la infraestructura debida para garantizar la integridad de matrices tanto biológicas como no biológicas.

Ejercicio Práctico 2.

En función de las muestras que consideraste en el Capítulo 1 que son de utilidad para aportar información a tu caso, indica lo que se solicita a continuación brevemente

1. ¿Qué volumen o cantidad de muestra(s) esperas recibir?
2. ¿Qué características debe cumplir el recipiente primario para contener adecuadamente las muestras que recibirás?
3. Describe ¿Qué características debe cumplir el recipiente secundario para garantizar la conservación de la muestra?
4. ¿Qué características debe reunir un embalaje para considerarlo como bueno o adecuado?
5. ¿Qué cuidados se debe tener para transportar y almacenar esas muestras biológicas?
6. ¿Qué características debe tener una bodega o almacén de donde provengan tus muestras para preservarlas adecuadamente?
7. En función de tus respuestas elabora una lista de cotejo que te permita revisar las condiciones en las que recibes las muestras durante la recepción

3. Protocolos de actuación Forense.

En esta sección se plasman los protocolos forenses necesarios para realizar adecuadamente el registro de cadena de custodia siguiendo en cada etapa del análisis toxicológico los formatos expedidos por la Procuraduría General de la República para su procesamiento y análisis.

Por esta razón, y siguiendo estrictamente las indicaciones emitidas en el Acuerdo A/009/15, en el análisis toxicológico forense es de vital importancia asegurar la identidad, e integridad de cualquier indicio o elemento material probatorio que sea remitido al laboratorio, por tal motivo, los protocolos de actuación forense tienen la finalidad de delimitar y especificar la labor de cada especialista. De esta manera, el requisitado de los diferentes formatos de Cadena de Custodia, tienen el objetivo de garantizar la mismidad y autenticidad mediante la **continuidad** y **trazabilidad** del indicio o elemento material probatorio y asentar la información del personal que interviene desde su localización, descubrimiento o aportación hasta que la autoridad competente ordene su conclusión en el registro de cadena de custodia, evitando de esta manera un actuar indebido que anule los análisis realizados a cierta muestra o indicio.

3.1. Cadena de Custodia.

A la luz de la entrada en vigor del sistema de justicia penal acusatorio, las autoridades de procuración y administración de justicia deben de estar preparadas para desempeñar una serie de atribuciones en aras del adecuado desempeño de su labor como servidores públicos. Particularmente, la actuación de la Procuraduría General de la República en materia de investigación de los delitos tiene una gran relevancia, y por tal motivo, la exigencia en cuanto al manejo que se le debe dar a los indicios o elementos materiales probatorios que pueda desahogarse como prueba servir de prueba durante el juicio.

En ese sentido y en virtud de la expedición del Acuerdo A/009/15 resulta necesario desarrollar las actividades relacionadas con la documentación del indicio

o elemento material probatorio a través del procedimiento de cadena de custodia que garantice su integridad, mismidad y autenticidad.

Según la PGR [53], la “**Cadena de Custodia**” es el sistema de control y registro que se aplica al indicio o elemento material probatorio, desde su localización, descubrimiento o aportación, en el lugar de intervención, hasta que la autoridad competente ordene su conclusión.

La Guía Nacional de Cadena de Cadena de Custodia [54], menciona que la “**Cadena de Custodia**” es un proceso transversal en la investigación de los hechos delictivos y/o proceso penal, la cual es responsabilidad de quienes, en cumplimiento de las funciones propias de su encargo o actividad en los términos de ley, tengan contacto con los indicios o elementos materiales durante cualquier parte del proceso. El documento donde se registra todo este proceso recibe el nombre de “**Registro de Cadena de Custodia**”, que es en donde se registran los indicios o elementos materiales probatorios y las personas que intervienen desde su localización, descubrimiento o aportación en el lugar de intervención hasta que la autoridad ordene su conclusión [53].

En la Guía Nacional de Cadena de Custodia queda estipulado que la cadena de custodia deberá comprender las siguientes etapas, mismas en las que se debe llevar a cabo el registro correspondiente:

- I. **Procesamiento** (responsable: Policía con Capacidades para Procesar y Peritos). Etapa en la cual, el Policía con Capacidades para Procesar y, en su caso, el perito, detecta, preserva y conserva los indicios o elementos materiales probatorios; ésta inicia con la localización, descubrimiento o aportación y concluye con la entrega a la autoridad responsable de su traslado.

Durante el procesamiento, se llevará a cabo la identificación, documentación, recolección y embalaje de los indicios o elementos materiales probatorios, a cargo de los Peritos y/o Policías con Capacidades para Procesar; según sea el caso, éstos podrán llevar a cabo las siguientes actividades elementales: observación, identificación, documentación

recolección, embalaje, sellado, etiquetado inventario y recomendaciones para el traslado de los indicios o elementos materiales probatorios.

Una vez llevadas a cabo estas actividades elementales, los Peritos y/o la Policía con Capacidades para Procesar y el Personal Facultado para el Traslado (PFT), deberán llevar a cabo las siguientes acciones de verificación y control de la Cadena de Custodia: verificar que el embalaje se encuentre debidamente sellado, etiquetado y firmado; cotejar la información entre la etiqueta del embalaje y el acta correspondiente; revisar que se cuente con la documentación de los indicios o elementos materiales probatorios; llenar el registro de cadena de custodia y finalmente, anotar las circunstancias no previstas en el registro de cadena de custodia.

- II. Traslado** (responsable: Peritos, Policía con Capacidades para Procesar y PFT). Esta etapa es materializada por el Perito y/o la Policía con Capacidades para Procesar, en caso de que éstos se encuentren imposibilitados para realizar el traslado, podrán encomendarlo al PFT. Quien lleve a cabo el traslado tiene como encomienda, transportar los indicios o elementos materiales probatorios, debidamente embalados, sellados, etiquetados, firmados y con el registro de Cadena de Custodia, del lugar de intervención, hacia los servicios periciales, a la bodega de indicios, a las Instituciones que cuenten con áreas forenses, o a algún otro lugar con condiciones suficientes para preservación o conservación, en cumplimiento a las recomendaciones de los especialistas, previo conocimiento del Ministerio Público. Durante esta etapa, quien realice el traslado documentará sus acciones, empleando los formatos de entrega-recepción de los indicios o elementos materiales probatorios y el registro de Cadena de Custodia. Cuando por causas de fuerza mayor, no puedan trasladarse los indicios o elementos materiales probatorios a la brevedad a los sitios antes mencionados, éstos deberán ser canalizados a almacenes temporales para su almacenamiento transitorio, informando de ello al Ministerio Público. Tan pronto cesen las causas que ocasionaron el impedimento y, se reúnan las condiciones logísticas necesarias, se realizará el traslado al lugar destinado,

según corresponda. Quien realice el traslado, deberá llevar a cabo las siguientes acciones, para la verificación y control de la Cadena de Custodia durante el traslado: verificar que el embalaje se encuentre debidamente sellado, etiquetado y firmado; cotejar la información entre la etiqueta del embalaje y el acta correspondiente; en su caso, registrar los ingresos y salidas de la bodega temporal; requisitar las actividades relacionadas con la continuidad y trazabilidad de los indicios o elementos materiales probatorios y finalmente anotar las circunstancias no previstas en el registro de cadena de custodia.

III. Análisis (responsable: Peritos, Especialistas y Policía con las Capacidades para Procesar). Es la etapa en la que se realizan los estudios a los indicios o elementos materiales probatorios, con el fin de determinar sus características relevantes para la investigación.

Cuando el análisis se lleve a cabo en los laboratorios de servicios periciales o instituciones con áreas para el análisis forense, el Perito o especialista deberá iniciar con la recepción y registro de los indicios o elementos materiales probatorios, continuará con el estudio correspondiente y con la emisión del dictamen, informe o requerimiento, y finaliza con la entrega de éstos, para el traslado a la bodega de indicios, o a algún otro lugar con condiciones de preservación o conservación.

Si al finalizar el análisis, se advierte remanente o se haya consumido la muestra, el perito o especialista deberá realizar la anotación correspondiente en el rubro de observaciones de Continuidad y Trazabilidad, del registro de Cadena de Custodia.

Cuando los estudios se realizan en campo, el Perito o la Policía con Capacidades para Procesar, iniciarán con la recolección de datos de los indicios o elementos materiales probatorios, continuarán con los estudios que se aplican a éstos, y terminarán con la emisión del dictamen, informe o requerimiento y, en su caso, con la devolución del bien, con autorización de la autoridad competente. En esta etapa, el personal que realiza el análisis, deberá utilizar el equipo de protección personal.

Cuando el personal de Servicios Periciales o instituciones con áreas para el análisis forense, reciba los indicios o elementos materiales probatorios, se realizarán las siguientes actividades elementales: análisis y/o estudio; elaboración del informe, requerimiento o dictamen; entrega de los indicios o su remanente.

Toda persona que tenga contacto con el indicio o elemento material probatorio, debe dejar constancia de su actividad o propósito, en el apartado de “continuidad y trazabilidad” del registro de Cadena de Custodia correspondiente. Durante esta etapa, el personal responsable del análisis, deberá considerar todas las acciones de verificación y control de la Cadena de Custodia que se encuentran descritas en la Guía Nacional de Cadena de Custodia. El personal responsable del análisis, empleará los formatos de registro de Cadena de Custodia, entrega-recepción de los indicios o elementos materiales probatorios, para documentar su actuación.

- IV. Almacenamiento en la Bodega de Indicios** (responsable: Responsable de la Bodega de Indicios, RBI). Esta etapa, es el conjunto de actividades que se efectúan para depositar los indicios o elementos materiales probatorios, en lugares adecuados que garanticen su conservación, hasta que la autoridad determine su destino, y comprende las etapas siguientes: recepción; salida temporal y salida definitiva.

Cada una de las anteriores tiene acciones subsecuentes reportadas en la Guía Nacional de Cadena de Custodia en donde también se encontrarán las acciones de verificación y control de la cadena de custodia que deberá realizar el Bien esta etapa, se emplearán los formatos de entrega-recepción de los indicios o elementos materiales probatorios y registro de Cadena de Custodia.

- V. Presentación de los indicios o elementos materiales probatorios a juicio** (responsable: quien haya realizado el traslado. Perito, Policía con Capacidades para Procesar o PFT). Esta etapa tiene como propósito, llevar a cabo la presentación de indicios o elementos materiales probatorios ante el órgano jurisdiccional, como prueba material a solicitud de las partes, e

inicia con la salida de éstos de la bodega de indicios o del lugar donde se encuentren resguardados, con el propósito de ser incorporados en juicio, para posteriormente, ser reingresados a la bodega y finalmente se realice su determinación judicial.

En la presentación de los indicios o elementos materiales probatorios ante el órgano jurisdiccional, participa quien haya realizado el traslado. Las acciones necesarias en esta etapa se encuentran asentadas en la Guía Nacional de Cadena de Custodia. En esta etapa, se emplearán los formatos de entrega-recepción de los indicios o elementos materiales probatorios y registro de Cadena de Custodia.

La disposición final de los indicios o elementos materiales probatorios, la determinará la autoridad competente, y podrá comprender alguno de siguientes supuestos: decomiso, devolución, destrucción, abandono, extinción de dominio o cualquier otro que determine la ley.

Para la instrumentación de cualquiera de los supuestos señalados en el párrafo anterior, se deberá atender la normatividad aplicable.

El **Acuerdo A/009/2015** completo emitido por la PGR se encuentra disponible en la página electrónica del Diario Oficial de la Federación (www.dof.gob.mx); mientras que la **Guía Nacional de Cadena de Custodia** puede consultarse en la página electrónica de la “normateca” de la Secretaría de Gobernación (www.secretariadoejecutivo.gob.mx/normateca/normateca.php). En los documentos originales se encuentran descritas las etapas anteriores a detalle, desde su inicio y conclusión, hasta el responsable de desarrollar cada una de ellas y la documentación específica que debe ser llevada durante dicho desarrollo.

Ejercicio Práctico 3.

Revise el formato de cadena de custodia anexo y conteste el siguiente cuestionario en función de sus respuestas en los ejercicios 1 y 2.

1. ¿Qué características externas relativas al registro de cadena de custodia debe tener el embalaje de las muestras que reciba?
2. ¿Qué datos administrativos debe revisar en el RCC?
3. Mencione las precauciones que se deben de tener antes de sacar un indicio de su empaque.
4. Mencione las precauciones que se deben tener al devolver un indicio a su empaque.
5. Antes de recibir sus muestras, lea los siguientes documento de RCC y elabore una lista de cotejo rápida que permita asegurar la integridad de la cadena de custodia en cada sesión del laboratorio (puede apoyarse en el ejemplo que se muestra como sugerencia).
6. ¿Qué precauciones se deben tomar en el llenado del RCC?

Sugerencia de lista de cotejo.

Característica	Sí	No
El documento de RCC está completo sin espacios en blanco		
La identidad de la persona que entrega corresponde con lo indicado en el RCC		
Hay concordancia entre el número de indicio en la etiqueta y en el RCC		
Los indicios corresponden a su descripción		
Se indican las condiciones óptimas para preservar los indicios		
Los indicios se entregan bajo las condiciones óptimas de traslado y almacenaje		
Las embalajes de los indicios están sellados de manera que se pudiera evidenciar su transgresión		
Los sellos contienen al menos una firma o rúbrica de las autoridades involucradas en el proceso de embalaje		
El RCC muestra continuidad		



REGISTRO DE CADENA DE CUSTODIA

Carpeta de investigación

Bolsa	Caja	Recipientes

4. **Servidores públicos** (Todo servidor público que haya participado en el procesamiento de los indicios o elementos materiales probatorios en el lugar de investigación deberá escribir su nombre completo, la institución a la que pertenece, su cargo, la etapa del procesamiento en la que intervino y su firma autógrafa. Se deberán cancelar los espacios sobrantes.

Nombre completo	Institución y cargo	Etapa	Firma

5. **Traslado** (Marque con "X" la vía empleada. En caso de ser necesario alguna condición especial para el traslado de un indicio o elemento, material probatorio en particular, el personal pericial o policial con capacidades para el procesamiento, según sea el caso, deberá recomendarla).

a) Vía:	Terrestre <input type="checkbox"/>	Aérea <input type="checkbox"/>	Marina <input type="checkbox"/>
b) Se requiere condiciones especiales para su traslado:	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>	
Recomendaciones:			



REGISTRO DE CADENA DE CUSTODIA

Carpeta de investigación

7. Continuidad y trazabilidad (Fecha y hora de la entrega recepción, nombre completo de quien entrega y de quien recibe los indicios o elementos materiales probatorios. Institución a la que pertenece, cargo dentro de la misma, propósito de la transferencia y firmas autógrafas. Anote las observaciones relacionadas con el embalaje, el indicio o elementos materiales probatorios o cualquier otra que considere necesario realizar. Agregue cuantas hojas sean necesarias. Cancele los espacios sobrantes después de que se haya cumplido con el destino final de indicio o elemento material probatorio).

Fecha y hora		Nombre, Institución y cargo	Propósito	Firma
Fecha y hora				
Observaciones				
Observaciones				
Observaciones				
Fecha y hora		Nombre, Institución y cargo	Actividad/propósito	Firma
Fecha y hora				
Observaciones				
Observaciones				
Observaciones				
Fecha y hora		Nombre, Institución y cargo	Actividad/propósito	Firma
Fecha y hora				
Observaciones				
Observaciones				
Observaciones				
Fecha y hora		Nombre, Institución y cargo	Actividad/propósito	Firma
Fecha y hora				
Observaciones				
Observaciones				
Observaciones				

Capítulo 3. Preparación de muestras.

El presente capítulo, de manera similar a la estructura del capítulo anterior, está dividido en pequeñas secciones que abordan la información relacionada a cada una de las matrices biológicas incluidas en el manual. La información aquí plasmada estará enfocada principalmente a la correcta manipulación de las distintas muestras con el fin de extraer o aislar los xenobióticos o sus metabolitos de la matriz que los contiene y proceder posteriormente a realizar los análisis tanto presuntivos como de confirmación.

Antes de abordar las secciones particulares para cada tipo de matriz, es preciso aclarar que en este capítulo no se hará diferencia entre el manejo de muestras ante-mórtem y post-mórtem ya que el tratamiento de cada una de ellas no depende del periodo de muestreo, es decir, la extracción de alguna sustancia en particular de su matriz (si es que la matriz la contiene), no cambia si la muestra fue tomada de un cadáver o de un individuo con vida.

Para esclarecer el por qué no se diferencia entre los periodos de muestreo en este capítulo basta con recordar que en las secciones 2.1, 2.2 y 2.3 se hace mención de las condiciones de conservación para cada matriz, lo que implica que las propiedades, por ejemplo, de la sangre, una vez recolectada, embalada y conservada, serán las mismas para una muestra ante-mórtem y una post-mórtem de forma tal que, para procesar la matriz y extraer, por ejemplo un barbitúrico, la secuencia de pasos será la misma ya que las propiedades fisicoquímicas de los barbitúricos no dependen del tiempo de muestreo. Empleando otro ejemplo, las digestiones que se realizan con agentes corrosivos o degradantes fuertes no diferencian entre el cabello de un cadáver ni de un individuo con vida, de igual forma realizarán la digestión de la matriz.

Lo antes expuesto no exime la labor del toxicólogo y del médico forense para evaluar la viabilidad del empleo de las matrices seleccionadas con base en las consideraciones pertinentes que deben hacer por los fenómenos de distribución y redistribución de las sustancias.

Una vez que se tiene en mente que los procesos de extracción del analito no dependen del tipo de muestra, sino de las propiedades de la matriz y las propiedades de la sustancia a extraer, es posible enumerar algunos de los factores determinantes en los rendimientos de extracción. Los primordiales a considerar para las extracciones son:

- Propiedades del xenobiótico o metabolito:
 - Carácter ácido o básico así como su pka.
 - Polaridad.
 - Solubilidad.
 - Electroneutralidad o carga de la molécula en la matriz.
 - Volatilidad.
 - Estabilidad reactiva (frente a qué tipo de reacciones).
 - Estabilidad térmica.
 - Grupo o familia de sustancias.
 - Coeficiente de reparto.
 - Etc.

- Propiedades de la matriz:
 - Estabilidad.
 - Propiedades fisicoquímicas.
 - Cantidad de proteínas presentes o carácter proteínico.
 - cantidad de lípidos presentes o carácter lipídico.
 - Composición de la matriz.
 - Etc.

- Propiedades del medio de extracción:
 - Medios acuosos.
 - Medios orgánicos.
 - pH del medio acuoso.

- Tipo de extracción (líquido-líquido; sólido-líquido).
 - Propiedades fisicoquímicas del medio.
 - Etc.
- Características del extracto en función de la técnica de análisis.
 - Acidez del extracto.
 - Polaridad del extracto.
 - Carácter acuoso u orgánico del extracto.
 - Fase del extracto.
 - Etc.

Los factores antes listados influirán en diferente medida según las características individuales de cada proceso jurídico relacionado en el cual, según sea necesario, se tendrán que realizar análisis específicos sobre una sustancia en particular, o en su defecto, se contemplarán procesos analíticos complejos que abarquen una gama de sustancias; recordando siempre que el conservar una porción considerable de la muestra que sirva para comprobaciones posteriores, representará una praxis recomendada y en ocasiones obligatoria.

1. Sangre.

La sangre es tal vez, por excelencia, la segunda matriz más seleccionada y empleada en todos los análisis toxicológicos relacionados con procesos jurídicos en todo el mundo no sólo por la información que puede obtenerse de ella, sino también porque a partir de las sustancias y sus concentraciones encontradas en la muestra, se pueden relacionar muchas conductas o consecuencias derivadas de la exposición a dicha sustancia que tienen una gran importancia en el esclarecimiento del suceso que se está investigando.

No es difícil pensar que por su gran empleo en diferentes análisis, la sangre es la matriz con mayor número de protocolos para su tratamiento previo, el cual está encaminado siempre en función del tipo de analito que se desee extraer.

Esta situación dificulta en gran medida la inclusión de un protocolo único para la preparación de muestras debido a que la extracción de los analitos difiere drásticamente, como se vio con anterioridad, en función de su naturaleza y sus propiedades. De este modo, el análisis de la concentración de metales pesados en la sangre requerirá una extracción en la que se empleen digestiones con ácidos minerales como el ácido nítrico o el ácido sulfúrico, por su parte, el empleo de este tipo de ácidos impedirá que se puedan realizar extracciones de compuestos orgánicos como lo son las sustancias de abuso y la mayoría de los plaguicidas del suero. Para este tipo de sustancias es común que las extracciones se realicen por medio del empleo de solventes orgánicos debido a que la afinidad de la sustancia de abuso o el plaguicida será mayor en el disolvente que la presentada en la matriz de extracción gracias a alguna de sus propiedades fisicoquímicas como la polaridad.

De igual forma, el tratamiento de la muestra debe realizarse pensando siempre en la técnica que se empleará para el análisis ya que, siguiendo el ejemplo anterior, algunos equipos de Absorción Atómica, ideales para la cuantificación de especies metálicas, permiten la introducción de muestras biológicas sin la necesidad de realizar algún tratamiento previo. Sin embargo, para asegurar la calidad y precisión de los resultados analíticos, son recomendables los extractos provenientes de las digestiones con mezclas de ácidos minerales ya que arrojan mejores resultados analíticos. En el lado opuesto, para los análisis de sustancias de abuso y plaguicidas, una de las técnicas más empleada es la cromatografía de gases con acoplamiento a espectrometría de masas en la cual, no existe la posibilidad de introducir extractos con tal acidez ya que dicho extracto dañaría el equipo y las columnas empleadas en la técnica analítica.

Además de estas implicaciones, son pocas las técnicas que permiten la introducción de muestras biológicas de forma directa. La mayoría de análisis requiere de una extracción que le garantice al analista poder eliminar el mayor

número de interferencias o contaminantes de la muestra y tener de forma aislada a los xenobióticos o sus metabolitos.

En la mayoría de las técnicas analíticas, la presencia de proteínas, lípidos o células pertenecientes a la matriz impedirían el correcto desarrollo de los análisis por lo cual, es común que los métodos de extracción requieran de un proceso de desproteización, eliminación de lípidos y/o la eliminación de las células que pudiesen poner en riesgo los resultados del análisis. Dicho lo cual, el tratamiento de las muestras a analizar (no sólo en el caso de la sangre, sino en general), debe centrarse en tres puntos principales previos a la extracción del analito que son:

1. Homogeneización.
2. Hidrólisis (especies conjugadas).
3. Desproteización.

La homogeneización de muestras sanguíneas resulta un proceso no muy complicado gracias a que al ser una matriz constituida mayoritariamente por compuestos formes y compuestos líquidos o parcialmente solubles en medios acuosos, el empleo de un vórtex o la agitación manual ligera son suficientes para lograr una homogeneidad satisfactoria previa a la secuencia de pasos analíticos necesarios.

Algunas matrices requieren de un proceso de hidrólisis tanto de los xenobióticos como de sus metabolitos de fase I y fase II antes de proseguir con la desproteización de la muestra, sin embargo, la sangre, **dado que es elegida principalmente para la búsqueda del xenobiótico sin biotransformar**, no requiere de este proceso de hidrólisis y los procesos de eliminación de proteínas pueden realizarse de forma inmediata una vez lograda la homogeneidad.

Los métodos de extracción homogénea presentan la formación de emulsiones si se emplean muestras con un alto contenido proteico; asimismo, las proteínas y demás componentes poco solubles pueden impedir que el líquido fluya en los cartuchos empleados en extracciones heterogéneas y promover la adsorción de los analitos evitando su correcta extracción de la muestra.

Por esta razón existen diferentes formas de desproteínizar la sangre que incluyen el empleo de sustancias como el ácido perclórico y acetonitrilo que han sido reportados por Álvarez et al [55], con grandes rendimientos en la desproteínización por precipitación en sangre total y plasma para el análisis de sustancias de abuso y compuesto orgánicos. Algunos otros solventes orgánicos que han sido empleados para la precipitación de proteínas son la acetona y el metanol de los cuales surge el inconveniente de que al tratar con muestras desconocidas, el empleo de metanol puede arrojar interferencias o falsos positivos a exposiciones a esta sustancia, por ejemplo, la presencia de metanol podría asociarse a una intoxicación accidental o intencional con dicha sustancia y evitar la detección de otros xenobióticos de interés jurídico, por lo cual, en toxicología forense su uso estará restringido a los casos en los que no se requiera la determinación de dicho solvente o que su presencia no esté asociada a una causa probable del hecho a investigar. Existen otras sustancias empleadas en la precipitación de proteínas que según su naturaleza pueden emplearse para tal fin según el criterio del analista, por ejemplo, pueden realizarse precipitaciones con metales pesados, en cuyo caso deben realizarse las mismas consideraciones que en caso del metanol. Algunos de los más empleados en el área toxicológica son el ácido túngstico, ácido tricloroacético e hidróxido de zinc, gracias a que no introducen interferencias con las determinaciones toxicológicas [56].

Una vez lograda la precipitación de las proteínas, el siguiente paso es centrifugar las muestras y filtrar el cúmulo de proteínas para tener un filtrado libre de ellas. Este proceso de desproteínización a pesar de ser el más empleado tiene el riesgo inminente de la pérdida de pequeñas cantidades de xenobióticos o sus metabolitos como resultado de la oclusión del analito por los componentes proteicos en la muestra de sangre total por lo cual será más recomendable realizarlo a los extractos plasmáticos de las muestras y no en muestras de sangre total.

Ya que se tiene una muestra libre de proteínas, la extracción de los analitos puede realizarse a través de alguno de los métodos disponibles para la matriz y la técnica a emplear.

Las extracciones pueden realizarse con grandes rendimientos por varios métodos, algunos validados para algunas sustancias en particular. En la actualidad varios organismos internacionales ponen a la disposición de los analistas los protocolos que han sido probados y validados para la extracción de algunas sustancias de interés jurídico. Un ejemplo es la UNODC que pone a disposición una serie de manuales para extracciones de sustancias de abuso en matrices biológicas específicas, dentro de estos manuales los protocolos de extracción se encuentran enfocados en alguna familia de compuestos. Algunos de los protocolos plasmados en estos manuales incluyen sustancias como las benzodiazepinas, barbitúricos, dietilamida de ácido lisérgico (LSD), fenciclidina (PCP), psilocibina, metacualona, entre otros.

Las extracciones pueden generalizarse gracias a que una vez desproteinizada e hidrolizada la muestra, los procesos de extracción suelen ser relativamente similares sin importar el tipo de matriz que se tenga. Los dos métodos de extracción más reportados son las extracciones homogéneas, llamadas así porque ambas fases (muestra y extractante) son líquidas y es comúnmente conocida como “Extracción Líquido-Líquido” (por sus siglas en inglés LLE). Aquellas extracciones en las cuales la muestra es líquida y el extractante es sólido, se llaman extracciones heterogéneas y son conocidas comúnmente como “Extracciones Líquido-Sólido”, o “Extracciones en Fase Sólida” (por sus siglas en inglés SPE). Existe una variante de este método de extracción llamada “Microextracción en Fase Sólida (SPME), que tiene el mismo fundamento de las SPE, pero emplea cantidades mínimas tanto de muestra, como de extractante.

Las extracciones líquido-líquido se recomiendan ampliamente gracias a que son rápidas, relativamente económicas y presentan rendimientos eficientes frente a fluidos biológicos con bajo contenido proteico, no solamente la sangre.

Las LLE deben realizarse en varios valores de pH según el valor de acidez de la sustancia a extraer, por lo tanto, el empleo de soluciones amortiguadoras es imprescindible.

El fundamento de estas extracciones radica principalmente en la afinidad de la sustancia por alguna de las dos fases, es decir, de acuerdo a su coeficiente de

partición (P) o coeficiente de distribución (D) entre la fase orgánica y la fase acuosa. Como la mayoría de las sustancias orgánicas (sustancias de abuso, plaguicidas, entre otros), una vez hidrolizadas o en forma neutra, presentan poca polaridad, la mayoría de ellas presentará mayor afinidad hacia la fase orgánica, permitiendo de esta manera, extraer el analito deseado.

En la Tabla 5, se muestran algunos solventes o mezcla de ellos, el grupo de sustancias que puede ser extraído y el rendimiento o porcentaje de recobro por LLE en muestras sanguíneas [28]:

Tabla 5. Solvente extractante, grupo extraído y porcentaje de recobro de algunas sustancias de abuso (United Nations International Drug Control Programme, 1997 [28]).

Solvente o mezcla	Sustancia extraída	Recobro
dietiléter (éter etílico)	Barbitúricos	78-93 %
Cloroformo	Barbitúricos	41-68 %
Hexano / Diclorometano (70:30)	Benzodiacepinas	79-90 %
Cloruro de n-butilo / Acetato de etilo (1:4)	Benzodiacepinas	91-100 %
Cloruro de n-butilo	LSD	>80 %

Las extracciones en fase sólida (SPE), han cobrado gran importancia en el área de la toxicología forense, clínica y en ensayos de diferentes sustancias orgánicas para una gran variedad de matrices biológicas, principalmente para los fluidos biológicos como la orina, sangre, plasma y suero, entre otros.

Las ventajas de este tipo de extracciones aumentaron con el avance en el empleo de instrumentos semiautomáticos y automáticos, sin menospreciar a los procesos manuales que fueron los pioneros. En general, los procesos de SPE consumen aproximadamente doce veces menos tiempo, y son aproximadamente cinco veces menos caras que las LLE. La mayoría de los sistemas semiautomáticos facilitan la aspiración del fluido a través de columnas mediante vacío. Estos procesos semiautomáticos ofrecen mayor recuperación y mejor precisión que los procedimientos manuales en los que las velocidades de flujo, la

siembra de la muestra y la elución son mucho más variables. Los sistemas automáticos a su vez, tiene la ventaja de disminuir la cantidad de trabajo repetitivo realizado por el personal del laboratorio por lo cual, en resumen, las SPE han demostrado ofrecer muchas ventajas frente a las LLE tradicionales incluyendo mayor selectividad, mejor reproducibilidad y obtención de extractos más limpios [57].

El aumento en la selectividad de la extracción de sustancias de abuso en particular se debe al empleo de una gran variedad de disoluciones amortiguadores, sorbentes y solventes. Una ventaja aún más importante de las SPE es el “efecto de concentración” ya que los sorbentes de sílica unida presentan un área superficial alta para interactuar con el analito deseado, una propiedad que provoca la concentración de pequeñas cantidades en el cartucho de extracción.

De manera análoga, la microextracción en fase sólida (SPME), es más simple y más rápida que las LLE y SPE convencionales, además de que produce extractos aún más limpios que los anteriores. Esta técnica tiene la peculiaridad de poder aplicarse a otras sustancias orgánicas de peso molecular intermedio.

Los métodos de detección consecutivos a las LLE, SPE y SPME tanto para sustancias de abuso como plaguicidas (entre otros xenobióticos y metabolitos de carácter orgánico), siguen siendo los métodos de separación como la cromatografía de gases (GC por sus siglas en inglés) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), con especial mención a las técnicas espectroscópicas acopladas como la espectrometría de masas (MS por sus siglas en inglés) para resultados de mayor precisión y exactitud [57].

2. Orina.

La orina es considerada la matriz de predilección en todo el mundo para análisis toxicológicos, en especial para la toxicología forense, gracias a que, como se revisó en el capítulo anterior, es la vía principal de eliminación de metabolitos de una amplia gama de xenobióticos. Presenta en forma general, rangos de tiempo de

aplicación intermedios que en algunos casos superan varios días en los que las determinaciones para la identificación, confirmación y cuantificación de analitos son factibles con su empleo y dado que su composición no es tan compleja como la de la sangre u otros tejidos susceptibles a análisis, los tratamientos de extracción suelen ser relativamente más sencillos que los requeridos para otras matrices.

En primer lugar, presentan la ventaja de una fácil homogeneización por ser una matriz líquida con poca coloración (en muestras obtenidas de personas sanas), o pocas partículas suspendidas en la muestra. En los casos en los que exista turbidez, esta puede eliminarse de forma rápida con centrifugación y extracción del sobrenadante o por filtración.

A diferencia de la sangre, las muestras de orina deben hidrolizarse para poder disminuir la polaridad de los metabolitos a través de la ruptura de las conjugaciones para poder favorecer la extracción de xenobióticos o sus metabolitos con disolventes orgánicos por medio de LLE o SPE. Otra razón que sustenta la necesidad del proceso de hidrólisis en muestras de orina es el hecho de que existen pocos estándares de referencia de especies conjugadas, por lo cual, la identificación y cuantificación de estas especies no es factible realizarla ni con el empleo de técnicas de gran selectividad ya que si no existe una referencia, no se puede garantizar la concordancia entre sustancias.

Los resultados de la conjugación a través de la beta-glucuronidación de grupos hidroxilo, carboxilo, amino, tioles; así como, la sulfatación de los grupos hidroxilo y amino, son los principales metabolitos de Fase II. Estos metabolitos son relativamente estables y pueden llegar a identificarse sin la necesidad de realizar una hidrólisis, sin embargo, los metabolitos de Fase I y los xenobióticos no biotransformados que presenten conjugaciones, necesitan, sin excepción alguna, de una hidrólisis para su correcta identificación y cuantificación [58].

Un método de hidrólisis en casos de emergencia que exigen resultados sumamente rápidos puede realizarse en un medio fuertemente acidificado o basicado. Este proceso puede acelerarse por las condiciones térmicas en las que se incuba la muestra; generalmente la incubación se realiza a 100°C con rendimientos muy elevados. Los procedimientos estandarizados indican el empleo

de ácido clorhídrico (37%) por un periodo de 15 minutos a 100°C cuando el factor limitante para el análisis es el tiempo. De cualquier forma, este tipo de hidrólisis ocasiona la destrucción de compuestos sensibles a condiciones tan ácidas o alcalinas, un ejemplo de estas sustancias son las benzodiazepinas, cocaína, opioides acetilados, entre otros.

Cuando no se requiere de un resultado analítico tan rápido, la mejor opción para realizar hidrólisis es a través de una hidrólisis enzimática. Este tipo de hidrólisis a pesar de necesitar más tiempo, ofrece la posibilidad de obtener extractos más limpios en condiciones medias de hidrólisis en las cuales el equipamiento no suele ser tan complejo.

Existen diferentes tipos de enzimas disponibles de forma comercial de las cuales, la más común es la β -glucuronidasa que en ocasiones se presenta combinada con arilsulfatasa; sin embargo, la elección de la enzima a emplear depende del metabolito de fase II que se desea hidrolizar. Para asegurar resultados confiables, es crucial prestar atención en las condiciones de pH y temperatura óptimas de preparación de las enzimas purificadas. La β -glucuronidasa, en particular la proveniente de *E. coli*, es la enzima que presenta mayores rangos de pH para su empleo (5.5 - 7.5), mientras que la proveniente de *Helix pomatia*, presenta un rango de empleo entre 4.5 y 5.5. La temperatura óptima para ambas enzimas oscila entre 50 y 60 °C, respectivamente. La combinación de enzimas β -glucuronidasa-arilsulfatasa de la *Helix pomatia* provee la ventaja de obtener extractos sumamente limpios de conjugados glucurónidos y sulfatados simultáneamente, pero las soluciones de *E. coli* permiten extractos más limpios de conjugados glucurónidos en comparación con la combinación anterior.

Un procedimiento típico de hidrólisis enzimática de conjugados glucurónidos es mezclar 1 mL de orina (conteniendo el estándar interno de la misma naturaleza glucuronida, si es que se usará ese método de cuantificación), y 1 o 2 mL de solución amortiguadora; posteriormente, se adiciona la enzima en una proporción de 1000 a 20000 unidades de enzima por cada mililitro de orina y, cuando sea necesario, la enzima arilsulfatasa, para proceder a incubar la mezcla a 37 °C por aproximadamente 16 horas, si se requiere realizar el procedimiento en menor

tiempo bien puede realizarse la incubación a 50 °C por 90 minutos como mínimo. Al concluir la incubación, el pH de la disolución se ajusta apropiadamente para las extracciones deseadas (LLE o SPE).

La hidrólisis de algunos conjugados como la morfina-6-glucuronido generalmente toma más tiempo que los conjugados glucurónidos fenólicos como la morfina-3-glucurónido.

Una vez conseguida la hidrólisis, es poco común que se requiera de un proceso de desproteización por la baja concentración presente en la orina, pero si la muestra así lo requiriese es posible realizar este procedimiento por medio de la desnaturalización de las proteínas por calentamiento [59], sin embargo, este proceso podría ocasionar la pérdida de xenobióticos o metabolitos con puntos de ebullición bajos por lo cual, una vez realizada la hidrólisis es recomendable proceder con las extracciones y análisis presuntivos.

Como ya se mencionó anteriormente, los métodos de extracción convencionales (LLE y SPE), presentan grandes porcentajes de recobro en orina y por la naturaleza líquida de la muestra, son comúnmente empleadas las extracciones de tipo LLE por su rápido y fácil manejo, sin embargo, como en todos los casos, la decisión final quedará a consideración del analista quien será el encargado de elegir el método de extracción después de haber razonado detenidamente toda la información disponible sobre el suceso en particular.

3. Cabello y Uñas.

En el análisis de cabello, al igual que en todas las matrices incluidas en el presente manual, la evaluación de toda la información posible sobre el caso, el individuo, las características de la muestra y si fuese posible de la sustancia, será determinante en la elección del pretratamiento de la muestra y su protocolo de análisis.

El cabello en particular tiene un pretratamiento significativamente diferente a las demás matrices ya que por sus características se requiere de un proceso de

descontaminación, solubilización u homogeneización, y posteriormente de la extracción del analito.

Según un informe sobre el análisis de sustancias de abuso y compuestos orgánicos emitido por la UNODC [23], el primer paso a realizar, es seccionar la muestra de cabello en segmentos de entre 10 y 30 milímetros para realizar el perfil histórico del individuo. En este mismo documento se reporta que en algunos casos, como en los relacionados a sustancias que facilitan la comisión de un delito, el análisis de fragmentos más pequeños ha mostrado gran utilidad en la determinación de la temporalidad del consumo o exposición a la sustancia en particular.

El análisis de segmentos alejados a la raíz puede proporcionar diagnósticos con poca correlación con la temporalidad del consumo de la sustancia debido a la continua exposición a agentes degradantes y al continuo lavado del cabello, además de cambios en el factor de incorporación de las sustancias en la matriz en función de la edad del cabello por lo cual, es recomendable realizar el análisis de forma progresiva iniciando por el segmento más cercano al folículo. De ahí la importancia en el protocolo de la toma de muestras de indicar el inicio y el final del cabello.

El proceso de lavado y descontaminación previo al análisis tiene dos objetivos primordiales:

- Mejorar el rendimiento de extracción del analito al reducir las interferencias probables por la existencia de residuos externos en la superficie del cabello de productos cosméticos, sudor, sebo, polvo y micropartículas depositadas.
- Remover la posible contaminación intencional con sustancias de interés forense como son las sustancias de abuso, plaguicidas o sustancias inorgánicas como los metales pesados, además de las posibles contaminaciones ocurridas dentro del laboratorio de investigación.

Algunos autores como Cairn et al [60] y Tsanaclis & Wicks [61], proponen analizar paralelamente las soluciones de lavado para diferenciar o evidenciar una

contaminación intencional, comparando los resultados obtenidos en la matriz y los resultados obtenidos en las soluciones de lavado. De cualquier forma, este proceso de descontaminación debe validarse en el laboratorio de investigación tomando en cuenta que el proceso de descontaminación afecta considerablemente la interpretación de los resultados cualitativos y cuantitativos.

Existen innumerables procesos de lavado reportados en la literatura, de los cuales ninguno ha obtenido la aprobación general de los analistas debido a que los solventes no protónicos como el diclorometano o acetonitrilo no siempre pueden eliminar residuos externos de sustancias polares o hidrofílicas, a pesar de no generar cambios en el volumen de la matriz y por consiguiente suponer que no generan pérdida de las sustancias incorporadas en el interior del cabello. Por el contrario, los solventes protónicos como el etanol e incluso el agua, pueden remover la mayoría de los contaminantes externos presentes en la superficie del cabello, sin embargo, tienen la desventaja de cambiar el volumen de la matriz, lo cual presenta el riesgo inminente de remover parte de los compuestos embebidos en el interior de la muestra. Debido a estos fenómenos observados en el proceso de lavado, muchos protocolos incluyen ciclos de lavado intercalando solventes orgánicos con soluciones acuosas que pueden o no contener surfactantes, según el criterio del analista.

Muchos protocolos de lavado sugieren combinaciones entre varias sustancias entre las que destacan, por haber sido probadas, las siguientes: dodecilsulfato de sodio (0.1M), solución amortiguadora de fosfatos, acetona, dietileter, metanol, etanol, diclorometano, hexano y pentano.

De cualquier forma, a continuación se proponen dos métodos sencillos con buena aceptación que pueden considerarse por los analistas [23]:

- Descontaminación con solventes orgánicos.
 1. Tomar una muestra de aproximadamente 100 mg.
 2. Lavar con 5 mL de diclorometano por dos minutos.
 3. Secar con papel adsorbente.

4. Lavar nuevamente con 5 mL de diclorometano por dos minutos.
5. Secar con papel absorbente nuevo.

- Descontaminación con solución acuosa.

1. Tomar una muestra de aproximadamente 100 mg.
2. Lavar con 10 mL de una mezcla de agua-dodecilsulfato de sodio al 0.1% (v/v), por tres minutos.
3. Enjuagar dos veces con 10 mL de agua por tres minutos.
4. Enjuagar una vez con 10 mL de acetona por tres minutos.
5. Secar en horno a 60 °C por tres minutos.

Es preciso mencionar que ambos protocolos son solamente sugerencias que el analista podrá considerar para su inclusión en el diseño del análisis o en su defecto, seleccionar algún otro reportado en la literatura.

Una vez realizado este procedimiento, es posible proceder a la extracción de los analitos contenidos en la matriz solubilizando o disolviendo los compuestos correspondientes. El primer paso es la homogeneización que puede realizarse cortando aproximadamente 20 o 30 mg de cabello (como mínimo), en fragmentos de 1mm y no mayores a 3mm, teniendo especial cuidado de que las tijeras no contengan ningún contaminante que pueda ser introducido en el análisis. Otro método de homogeneización es a través del empleo de un molino de bolas que realice la molienda de la muestra.

Las extracciones de compuestos orgánicos en general pueden realizarse con una gran variedad de solventes dentro de los que destacan el metanol, soluciones acuosas acidificadas, soluciones amortiguadoras, digestiones con disoluciones de hidróxido de sodio y digestiones con mezclas de ácidos minerales (principalmente agua regia). Las extracciones de especies metálicas o metaloides generalmente se llevan a cabo con digestiones de disoluciones de ácidos minerales concentrados.

Las extracciones con metanol pueden disolver compuestos neutros, hidrofílicos y moderadamente lipofílicos. Someter la muestra a un proceso de sonicación en un baño ultrasónico mejora el proceso de extracción. Presenta la ventaja de poder extraer casi todas las sustancias de abuso y una gran variedad de sustancias orgánicas, además los extractos pueden introducirse inmediatamente en equipos de análisis como GC-MS o HPLC-MS. La combinación de metanol con soluciones acuosas acidificadas ha demostrado mejoras en la cantidad de sustancias de abuso extraídas, sin embargo, las extracciones con metanol requieren de procesos de purificación con técnicas como LLE y SPE, además de que el porcentaje de recobro para sustancias ionizables suele ser más bajo que en otros procesos de extracción.

Las extracciones con disoluciones acuosas acidificadas y con disoluciones amortiguadoras se realizan incubando la muestra con ácido clorhídrico (0.01-0.50 M) o en disoluciones amortiguadoras de fosfatos (1M) a pH 6.4-7.6, a 56°C o 60°C respectivamente durante toda una noche. Estas extracciones son más limpias que las realizadas con metanol y los compuestos orgánicos de carácter básico y muestran porcentajes de recobro elevados. El inconveniente con estas extracciones es la hidrólisis de sustancias susceptibles a estas condiciones, por ejemplo, se ha reportado la conversión parcial de cocaína en benzoilecgonina; la conversión de heroína (diacetilmorfina), en 6-monoacetilmorfina (6-MAM); así como la hidrólisis de 6-MAM en morfina.

Por su parte, las extracciones con digestiones en disoluciones de hidróxido de sodio (1M), se incuban por una hora a 80°C o durante toda una noche a 60°C y se aplican a sustancias que son estables bajo condiciones alcalinas. Estas extracciones presentan grandes rendimientos para sustancias como la nicotina, anfetaminas, metabolitos de cannabinoides y algunos neurolépticos. Estas extracciones pueden usarse en combinación con SPME y posteriormente introducirse en análisis de tipo “*headspace*” para compuestos semivolátiles como anestésicos locales, barbitúricos, fenciclidina, ketamina, metadona, PCP, tramadol, fenotiazinas y antidepresivos tricíclicos. Este método presenta las desventajas de no poder aplicarse para sustancias inestables en medios alcalinos como la cocaína

y las benzodiazepinas; además de que las digestiones requieren procesos de purificación exhaustivos. Los metales pesados no pueden extraerse con esta técnica ya que a valores de pH alcalinos, los metales presentes en disolución forman hidróxidos los cuales suelen ser insolubles en medios acuosos y no pueden someterse a procesos de purificación fácilmente.

Las extracciones con disoluciones de ácidos minerales suelen realizarse para la extracción de metales pesados en matrices biológicas. El agua regia (HNO_3/HCl 1:3) suele ser la mezcla más empleada ya que por ser corrosiva y por su acidez puede asegurar la presencia de especies metálicas como iones libres dentro de la disolución, los cuales son susceptibles a ataques de especies quelatantes (complejantes) y posteriormente proceder a realizar los análisis de confirmación por técnicas espectroscópicas como absorción atómica (AAS) o plasma acoplado inductivamente (ICP).

Gracias a que el cabello es una matriz queratinizada al igual que las uñas, los procesos antes descritos pueden emplearse de forma análoga para el pretratamiento de muestras de uñas y lecho ungueal, con la condición de su previa verificación y validación en el laboratorio en donde se realice el análisis.

4. Saliva (Fluido Oral; OF).

La saliva o fluido oral requiere de un pretratamiento de las muestras a analizar completamente diferente a las muestras sanguíneas gracias a la composición de dicha matriz. En este caso la concentración de proteínas que pudiesen interferir en los análisis es drásticamente baja en comparación con la sangre, además de que no necesita de homogeneización ni tampoco de hidrólisis previa a la extracción de analitos.

Este tipo de matriz puede someterse a pruebas presuntivas como los inmunoensayos solamente tras haber sido diluidas con la solución amortiguadora adecuada, o puede ser directamente analizada (tras dilución), con técnicas de confirmación como HPLC-MS.

Las interferencias que se presentan en los análisis se deben principalmente a que pueden existir interacciones entre el analito y las mucoproteínas presentes en la saliva, o en su defecto por coprecipitaciones del analito durante el proceso de centrifugación al que suelen someterse las muestras para eliminar partículas suspendidas en la muestra. Para evitar este tipo de interferencias, pueden emplearse los métodos de extracción mencionados en el apartado anterior que son LLE, SPE y principalmente SPME por la cantidad de muestra disponible en la mayoría de los casos.

Otra de las interferencias que puede encontrarse comúnmente en los análisis de saliva es debida a la presencia de mucina (lubricante que da viscosidad a la saliva), que puede eliminarse con ciclos de congelación-descongelación.

La principal complicación en el pretratamiento o extracción de analitos en esta matriz se debe a que para muchas sustancias de administración oral, se presenta una baja concentración de xenobióticos, este fenómeno sumado a que la cantidad de muestra que puede obtenerse para los análisis es escasa, implica que es preferible realizar los estudios sin la eliminación rigurosa de las proteínas. Un estudio realizado para comparar los límites de corte de un proceso analítico entre las concentraciones de sustancias de abuso encontradas en sangre en comparación con saliva arrojó los datos que se muestran en la Tabla 6. La serie analítica empleada a grandes rasgos consistió de una LLE/SPE, seguido de una separación por GC/LC con MS como método de cuantificación, en muestras tomadas a conductores de transportes colectivos en Estados Unidos [23].

Tabla 6. Comparación de límites de corte para la serie analítica entre sangre y saliva (United Nations International Drug Control Programme, 2014 [23]).

Sustancia	Límite de corte Sangre (ng/mL)	Límite de corte Saliva (ng/mL)
Alprazolam	10	3.5
Anfetamina	20	360
Benzoilecognina	50	95
Clonazepam	10	1.7

Cocaína	10	170
Codeína	10	94
Diazepam	140	5.0
Etanol	0.1 (g/L)	0.082 (g/L)
Flunitrazepam	5.3	1.0
Lorazepam	10	1.1
MDA	20	220
MDEA	20	270
MDMA	20	270
Metadona	10	22
Metanfetamina	20	410
Morfina	10	95
Nordiazepam	20	1.1
Oxazepam	50	13
THC	1.0	27
Zolpidem	37	10
Zopiclona	10	25
Tramadol	50	480
6-MAM	10	16

Como puede observarse en la tabla anterior, las concentraciones de los xenobióticos pueden variar drásticamente de sustancia a sustancia, dificultando la elección del pretratamiento de las muestras, por lo cual, es común que la mayoría de las muestras analizadas con fines toxicológicos sean tratadas de forma simple con SPME tras haber sido diluidas con el buffer adecuado con base en las características de la sustancia de interés.

5. Bilis.

En los últimos años el empleo de bilis como una matriz alternativa ha cobrado un gran auge gracias a que puede seleccionarse cuando existe ausencia de orina para análisis toxicológicos. Otra de las razones por las cuales muestra una

gran utilidad es debido a que en muchas ocasiones puede presentar concentraciones más elevadas de xenobióticos y metabolitos que la sangre y la orina debido a su doble carácter hidrofílico y lipofílico, además de contener simultáneamente tanto a las sustancias no biotransformadas, como a sus metabolitos. Generalmente se encuentran en la bilis, compuestos con peso molecular entre 500 o 600 Daltons [62].

Su pretratamiento que es más complicado que el de otras matrices por su viscosidad y por la presencia de ácidos y sales biliares. Al igual que la sangre, requiere de las tres etapas de pretratamiento de homogeneización, hidrólisis y desproteinización.

Para conseguir la extracción de los metabolitos presentes en la matriz, se sugiere homogeneizar 1.0 mL de bilis con la ayuda de un equipo vórtex por al menos 15 segundos sin la adición de ninguna sustancia para eliminar la viscosidad. En el caso de elegir el método de cuantificación por estándar interno, la adición del estándar seleccionado se realiza antes de agitar en el vórtex.

De manera similar a la orina, los metabolitos presentes en la bilis suelen ser especies conjugadas con grupos glucurónidos y grupos sulfato por lo cual la hidrólisis de estas muestras puede realizarse empleando el mismo método que el enunciado anteriormente para la orina. Como se mencionó antes, cuando los resultados analíticos requieran una gran rapidez podrán realizarse la hidrólisis ácida o básica con especies minerales como el ácido clorhídrico o el hidróxido de sodio; sin embargo, las hidrólisis enzimáticas presentan mejores resultados y no tienen el inconveniente de degradar sustancias orgánicas sensibles a las condiciones alcalinas o ácidas de los agentes minerales.

Un ejemplo de hidrólisis enzimática presentada para el análisis de THC y sus metabolitos en bilis reporta el uso de β -glucuronidasa con buffer de acetatos (pH=7), con incubación por 16 horas a 37 °C [63], como podrá notarse, la enzima y las condiciones de incubación son idénticas A LAS DE la orina; sin embargo, debido a la viscosidad de la muestra a analizar, es necesario la homogeneización en cada paso.

Así como para la hidrólisis se emplean procesos análogos a los de la orina, para el proceso de desproteínización se pueden elegir o diseñar métodos similares a los empleados en la sangre. Uno de los procedimientos más reportados de desproteínización en muestras bilis es el empleo de técnicas de precipitación a través de solventes orgánicos, principalmente acetonitrilo por no introducir interferencias con las determinaciones analíticas de sustancias orgánicas. La diferencia sustancial entre el proceso de desproteínización de la sangre con respecto a la bilis es que para esta última, la adición del volumen requerido para la precipitación de las proteínas se realiza mientras la muestra se mantiene en agitación, de preferencia y como se ha venido señalando, con el empleo de un vórtex. La eliminación de las proteínas se realiza centrifugando la muestra en las condiciones adecuadas de velocidad y tiempo, y finalmente, se procede a decantar el sobrenadante para posteriormente evaporar el disolvente usado en la desproteínización.

En el ejemplo anterior para el análisis de THC y sus metabolitos en bilis, el proceso de desproteínización se realiza agregando 3.0 mL de acetonitrilo y centrifugando a 2000 rpm por 5 minutos [63]. Como puede observarse en la sección 1 del Capítulo 4 del presente manual, el proceso es sumamente similar al empleado en el tratamiento de la sangre.

Como etapa final en la preparación de la muestra, el proceso de extracción recomendado para las muestras de bilis son los métodos de tipo SPE. Para optimizar este tipo de extracciones se recomienda evaporar el solvente casi a sequedad hasta tener 0.5 mL de muestra hidrolizada y desproteínizada.

Una vez conseguidos los extractos, las técnicas de análisis de confirmación recomendadas son los métodos acoplados entre las técnicas de separación y las técnicas espectroscópicas, por ejemplo, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GS-MS).

6. Contenido Gástrico.

El pretratamiento del contenido gástrico suele variar dependiendo de la referencia consultada por la gran cantidad de componentes presentes en la muestra. Como se mencionó anteriormente, el contenido gástrico puede contener restos hemáticos que modificarán sus propiedades y por consiguiente su pretratamiento también.

Cuando el contenido gástrico presenta características normales y una consistencia considerablemente líquida, el proceso de homogeneización no requiere de una dilución ni de una maceración, sin embargo, dadas sus características necesita un proceso de homogeneización y desproteización adecuado.

El proceso de hidrólisis no es necesario en el tratamiento de estas muestras ya que la detección de compuestos orgánicos en esta matriz indica una exposición o consumo reciente, además de que el contenido gástrico participa en la etapa de absorción de los xenobióticos por lo cual, la presencia de metabolitos será prácticamente nula, salvo en algunas excepciones en las cuales los procesos post-mórtem promueven la difusión de los metabolitos contenidos en la bilis del duodeno hacia el estómago [64].

Para el proceso de homogeneización puede emplearse primero un equipo vórtex para agitar la muestra, en los casos que se presenta poca consistencia líquida, pueden realizarse diluciones 1:1 con agua destilada [65].

Dado que el proceso de hidrólisis no resulta necesario, a menos que el analista lo considere pertinente; puede procederse a realizar un proceso de desproteización de la misma manera en que se planteó con la sangre y la bilis. Este proceso es sumamente importante en los casos en que existe la presencia de restos hemáticos que pueden alterar los análisis toxicológicos. El empleo de acetonitrilo para la precipitación de proteínas y la centrifugación de la mezcla para extraer el sobrenadante, resulta nuevamente efectivo según lo reportado por Cheng & Liang [65], quienes identificaron y cuantificaron 34 sustancias de abuso en

muestras de sangre, orina y contenido gástrico obteniendo un límite de detección para el contenido gástrico de 0.05-20 ng/mL, es decir, entre 0.05 y 20 ppb.

La purificación o extracción de los xenobióticos puede realizarse tanto con técnicas tipo LLE, como de tipo SPE, teniendo mejores resultados las extracciones en fase sólida por la cantidad de muestra obtenida tras el proceso de desproteización.

7. Hígado.

El hígado es una de las matrices de mayor empleo en los análisis toxicológicos *post-mórtem* gracias a que es el principal órgano encargado de la biotransformación de xenobióticos y es un tejido susceptible a fungir como reservorio tanto de sustancias sin biotransformar como de sus metabolitos.

De la misma forma que para la bilis, al contener xenobióticos y metabolitos, el proceso de hidrólisis y desproteización en el pretratamiento de la muestra son imprescindibles, sin embargo, al ser un órgano de estructura compleja el proceso de homogeneización requiere de un tratamiento conocido como “alteración física” y es empleado también en otras matrices como el músculo, cerebro, riñón y otros órganos o tejidos complejos para facilitar las extracciones de tipo LLE y SPE [62].

La alteración física es un proceso alternativo para la homogeneización que emplea enzimas proteolíticas no específicas como la subtilisina Carlsberg, neutrasa, papaína, tripsina o ácidos minerales fuertes. La digestión con este tipo de enzimas proteolíticas producen una muestra fluida más fácil de manejar durante el análisis y permiten la liberación de xenobióticos y metabolitos de sus sitios de unión dentro de la matriz. Como en los casos anteriores, la selección de la enzima proteolítica dependerá de la estabilidad de los analitos a diferentes valores de pH en la digestión y de la liberación de las sustancias. Un ejemplo es la subtilisina Carlsberg que para su empleo óptimo requiere de un pH arriba de 10, valores a los cuales la cocaína y el ácido acetilsalicílico son inestables ya que presentan un mejor rendimiento de recobro a valores cercanos a 7.4. Por su parte, algunas

sustancias de abuso como el amobarbital y el diazepam presentan rendimientos de recobro sumamente elevados tanto a pH 7.4, como a pH 10, siendo la subtilisina Carlsberg para estas sustancias la mejor opción de tratamiento.

La homogeneización alternativa que sigue presentando un alto índice de empleo es la maceración y molienda de una fracción del hígado con el empleo de morteros y pistilos sin embargo, este proceso presenta una mayor complejidad y suele ser empleado en laboratorios analíticos de baja complejidad.

A pesar de que el proceso de desproteización, una vez obtenida una muestra líquida por el proceso de alteración física del hígado, puede realizarse de forma similar a las matrices anteriores, se prefiere optar por el proceso de salificación para muestras provenientes de tejidos complejos [62]. La adición de grandes cantidades de sales iónicas que se hidratan, desprovee de la suficiente humedad a las proteínas para mantenerse en solución provocando que las proteínas precipiten y sean eliminadas por centrifugación o por procesos de filtración. La ventaja que provee la desproteización por salificación es que no modifica en gran medida el pH de la disolución de la muestra y por lo tanto, la inestabilidad de las sustancias en condiciones sumamente ácidas o alcalinas no será un factor determinante en los procesos de extracción de los analitos.

Adicional al proceso de desproteización, se requiere la eliminación de componentes lipídicos de las muestras de carácter lipídico como los tejidos grasos, ya que al realizarse extracciones con disolventes orgánicos, pueden formarse emulsiones que dificultan la extracción de los analitos.

La eliminación de lípidos de las matrices de interés puede ser un gran problema en el proceso de análisis debido a que estas emulsiones formadas suelen ser difíciles de destruir inclusive con el empleo de centrifugación prolongada. Este proceso de eliminación puede conseguirse con una extracción de lípidos de la matriz, sin el ajuste de pH por medio de soluciones amortiguadoras o con solventes sumamente no polares como el hexano que permite la disolución de componentes lipídicos, pero no la solubilidad de las sustancias de interés como las sustancias de abuso y los plaguicidas (entre otros compuestos de carácter orgánico). Sin embargo, por las características tóxicas del hexano, se ha preferido el empleo de

sustitutos como el isohexano que es una mezcla de isómeros del hexano con una baja concentración de n-hexano que es lo más recomendable según Lappas & Lappas [62].

Finalmente, los procesos de hidrólisis y extracción son procesos homologados con los que se emplean para las muestras de orina y bilis, colocando nuevamente a la hidrólisis enzimática como el proceso de preferencia cuando el tiempo de análisis no es el factor limitante para la obtención de resultados, y a las extracciones de tipo SPE para la obtención de extractos más limpios en tiempos más cortos [62].

Ejercicio Práctico 4.

En función de las muestras que recibiste la clase anterior y considerando la estabilidad y características el xenobiótico o metabolito del que sospechas, elabora:

1. Diagrama de flujo para la preparación de cada una de las muestras, incluyendo los volúmenes de reactivos a adicionar y los residuos generados en cada etapa.
2. Lista de material y reactivos a emplear.
3. Volumen y procedimiento de preparación de las soluciones necesarias para el tratamiento de tus muestras.
4. Reporte de seguridad e higiene para cada reactivo a emplear (usar el formato proporcionado en los capítulos previos).
5. Listado de residuos a generar al final de la clase.

Capítulo 4. Pruebas de orientación o presuntivas.

El contenido de este capítulo está enfocado en las diversas pruebas presuntivas que sirven en primera instancia, independientemente del resultado positivo o negativo, para guiar al analista en la búsqueda de sustancias de interés forense en las diferentes matrices biológicas.

Es importante que el alumno todo el tiempo tenga en mente las implicaciones que conlleva la aplicación de estas técnicas, y es de vital importancia que emplee su punto de vista crítico para la correcta interpretación de los resultados de cada una de ellas puesto que de esta interpretación dependerá la toma de decisiones sobre la búsqueda de xenobióticos y/o metabolitos de interés y el desarrollo del protocolo de actuación.

Dentro de los análisis toxicológicos, clínicos o forenses, existen dos grandes categorías de clasificación:

- Análisis presuntivos.
- Análisis de confirmación.

Las pruebas presuntivas tienen la característica de contar con protocolos o metodologías que arrojan resultados rápidos que sirven principalmente para descartar, en un primer paso de análisis, la mayor cantidad de familias de xenobióticos posible; sin embargo, no cuentan con la especificidad para identificar una sustancia en particular, sino solamente un conjunto o una familia de sustancias. En otras palabras, la aplicación de las pruebas presuntivas ayuda al analista a inferir el tipo de sustancias sobre las que debe centrar su búsqueda y análisis, evitando de esta manera la realización de pruebas confirmatorias que no tengan justificación o que conlleven a prolongar los tiempos de análisis, y por consiguiente, el empleo de una mayor cantidad de reactivos y la generación de más residuos. Así por ejemplo, el análisis sobre el consumo de sustancias de abuso puede ser limitado a la familia de opiáceos tras la aplicación de una prueba presuntiva y centrarse en identificar certeramente a la sustancia específica, en vez

de realizar cromatografías con múltiples estándares de referencia de diferentes familias de sustancias que son, en primer lugar muy costosos y en segundo lugar innecesarios.

La posibilidad de buscar múltiples sustancias en un análisis presuntivo mostrará una mayor probabilidad de obtener resultados positivos, dada la gran variedad de sustancias detectables con esa metodología, mientras que el empleo de alguna técnica para buscar una sustancia específica tendrá una mayor tendencia a mostrar resultados negativos, por la diversidad de sustancias posibles en la matriz empleada con los mismos efectos tóxicos o al menos similares en el individuo.

En la actualidad existen diversos métodos no instrumentales que permiten realizar análisis presuntivos de diferente índole según su fundamento entre los cuales se engloban los siguientes:

- Separación o cromatográficos (TLC).
- Inmunoensayos.
- Colorimétricos
- Espectroscópicos.

Un punto de suma importancia en esta etapa del análisis es remarcar que la prueba confirmativa para la sustancia de interés y/o su cuantificación, no debe estar basada en el mismo fundamento, o similar, al empleado como método presuntivo ya que de existir alguna debilidad o interferencia en este método, se pueden presentar las mismas susceptibilidades en el análisis confirmativo. De esta manera, una metodología de análisis aceptable debe incluir, por ejemplo, una técnica colorimétrica o un inmunoensayo como prueba presuntiva, seguida de una técnica cromatográfica como prueba confirmatoria, de preferencia acoplada a una espectrometría de masas [42].

1. Cromatografía en capa fina (CCF por sus siglas en español o TLC en inglés).

La cromatografía es una técnica de separación e identificación versátil que presenta distintas variantes; sin embargo, todo estudio cromatográfico posee dos fases que son una móvil y otra estacionaria (fija), las que interactúan manteniendo un contacto continuo. La muestra se introduce en el sistema y la fase móvil la hace avanzar recorriendo la fase estacionaria. Los componentes de la muestra se separan según su afinidad por las fases, estableciendo un parámetro que se denomina "*R_f*" (relación de frente), que es la distancia que recorre la sustancia con relación al frente de solvente. Si un componente posee mayor afinidad por la fase móvil, el producto se desplaza más rápidamente, mientras que si es más afín con la fase estacionaria, el producto queda retenido y su avance es mucho menor. De acuerdo con la naturaleza de la fase estacionaria, la cromatografía puede ser de adsorción o de partición.

En la cromatografía de adsorción, los componentes de la muestra serán retenidos por la superficie del componente de la fase estacionaria (sólida o líquida). Así por este simple procedimiento, las diferentes estructuras químicas de los componentes de una mezcla se separarán entre sí.

Si bien el comportamiento de los componentes depende de varios factores, en muchos casos pueden hacerse algunas predicciones:

- Para compuestos de peso molecular comparable, aquellos que tengan una polaridad mayor tienen menor tendencia a moverse del punto de partida en un sistema polar.
- Para compuestos de polaridad comparable, serán más retenidos aquellos que posean el peso molecular más grande en sistemas iguales.

En una cromatografía de partición, tanto la fase móvil como la fase estacionaria son líquidas, produciéndose la separación de los componentes de la muestra según la "Ley de Reparto de Rault", de acuerdo con la solubilidad de las

sustancia en líquidos no miscibles, lo que ocurre de acuerdo con la constante de partición del sistema.

La CCF es pues, una técnica cromatográfica de adsorción y la fase estacionaria puede estar constituida por diversos tipos de adsorbentes, siendo los más comunes la sílica gel y la alúmina [42].

En la placa cromatográfica se deposita la mezcla a analizar sobre una línea a 5 o 10 mm del borde inferior de la placa. Se coloca luego en una cámara de elución cromatográfica que contiene la fase móvil, la cual moja la parte inferior de la placa y asciende por diferentes acciones fisicoquímicas. Este proceso se llama desarrollo del cromatograma.

El desarrollo termina cuando la fase móvil alcanza los 10 cm desde el punto de aplicación para placas de CCF o macrocromatografía, o de 5cm desde el mismo lugar para placas de nanocromatografía, desde el punto de aplicación. Esta línea que marca el solvente se denomina “frente de solvente” (o frente de elución).

En el caso de que las sustancias sean coloridas, se identifican a simple vista las posiciones de los distintos pigmentos separados. En caso de ser incoloros se debe recurrir a un “revelador”. Existen varios tipos de reveladores, pueden usarse reveladores corrosivos, generalmente se utiliza yodo [66], el cual forma complejos coloridos con los componentes orgánicos (en tonos amarillo-marrón), pero las manchas desaparecen con el tiempo por lo que es conveniente señalar las manchas aparecidas. Otro reactivo revelador bastante utilizado es el ácido sulfúrico, que reacciona con los componentes orgánicos produciendo manchas negras. Sin embargo debe tenerse en cuenta que el tamaño de las manchas no está relacionado con la cantidad de componente separado.

Cuando se desarrolla el cromatograma, mientras el solvente alcanza una determinada altura en la placa, los componentes de la muestra se moverán una distancia menor o igual a la del solvente. El cociente entre la distancia recorrida por el solvente y la recorrida por un determinado componente recibe el nombre de relación de frente (R_f) y siempre es menor o igual a uno (Figura 4). La relación de frente puede emplearse como criterio de identificación negativo (exclusión), ya que si dos sustancias tienen diferentes R_f , entonces no son el mismo compuesto, pero

no se puede afirmar que dos sustancias que tienen idéntico R_f sean el mismo compuesto ya que dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas, será el avance que tengan dentro de la cromatografía.

La CCF se emplea en la búsqueda presuntiva de diversas sustancias, entre las que se encuentran principalmente las que se pueden extraer de las matrices de análisis con extracciones líquido-líquido y sólido-líquido debido a que las fases gaseosas no pueden aplicarse en la placa cromatográfica. Algunos ejemplos de análisis son los plaguicidas como los organofosforados y organoclorados; así como las sustancias de abuso en cuyo caso, es una de las técnicas más empleada dentro de los protocolos de análisis presuntivo.

Esta técnica ha sido empleada para analizar muestras de individuos que presentan signos de sobredosis debido a su propiedad de poder separar un número relativamente grande de sustancias al mismo tiempo, principalmente cuando los médicos o el analista desconocen la identidad del agente causante de tal sobredosis [42].

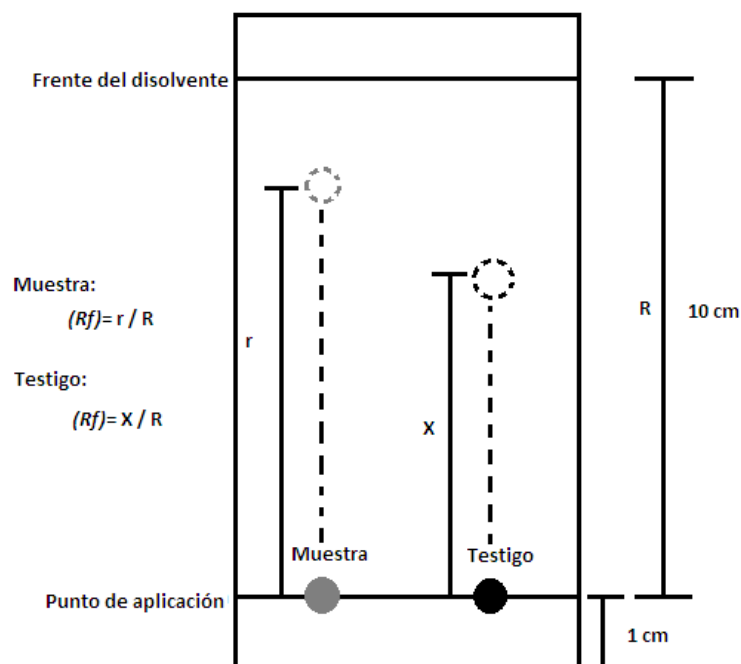


Figura 4. Cromatograma comparativo entre una muestra desconocida y un patrón o testigo en donde se muestra el cálculo de R_f para muestra y testigo.

2. Análisis Inmunológicos.

Los análisis inmunológicos se emplean en el campo toxicológico, incluida el área forense, cuando se tiene que analizar múltiples muestras en un tiempo limitado y cuando se desea realizar un análisis sobre una muestra de la cual se desconoce información que pudiese orientar al investigador sobre las sustancias contenidas en el espécimen. Dicho lo anterior, los análisis inmunológicos se emplean como análisis presuntivos en la búsqueda de una o varias sustancias contenidas en una muestra.

Los análisis inmunológicos tienen como fundamento la unión entre una sustancia “blanco” (antígeno) con un anticuerpo. Los anticuerpos (Ac) son, básicamente, Inmunoglobulinas (Ig), que se unen a diferentes antígenos endógenos o exógenos presentes en el organismo como son los carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Existen diferentes tipos de inmunoglobulinas entre las que destacan las IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, de las cuales, las inmunoglobulinas de tipo IgG (representada por la letra “Y”), son las que se emplean en la mayoría de los inmunoensayos [33]. Los anticuerpos están formados por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, estos anticuerpos tienen dos fragmentos o regiones, la fracción cristalizable o Fc, y el fragmento de unión al antígeno o Fab, esta última tiene en su estructura una fracción constante y una variable de cada una de las cadenas pesada y ligera en el extremo amino terminal del monómero del anticuerpo. Esta fracción variable (paratopo) corresponde es lo que permite identificary unirse a antígenos específicos.

Los antígenos (ag) son sustancias, proteínas normalmente, que puede causar la formación de anticuerpos cuando se introducen en un organismo hospedero. Existen algunas sustancias de bajo peso molecular (menos de 10,000 daltones) denominada haptenos, las cuales no tienen propiedades inmunogénicas por si mismas pero al unirse a un acareador, normalmente una proteína como la albúmina, estimulan una respuesta inmune. El mecanismo observado entre el

antígeno y el anticuerpo es similar al presentado, burdamente, entre las cerraduras y las llaves (Figura 5), el cual determina la afinidad y unión de estas sustancias en una disolución. De esta manera, el concepto central de los inmunoensayos es la reacción de unión antígeno-anticuerpo la cual puede estar acoplada a otros mecanismos reveladores que proveen de resultados coloridos a la prueba cuando esta unión se presenta en el análisis [67].

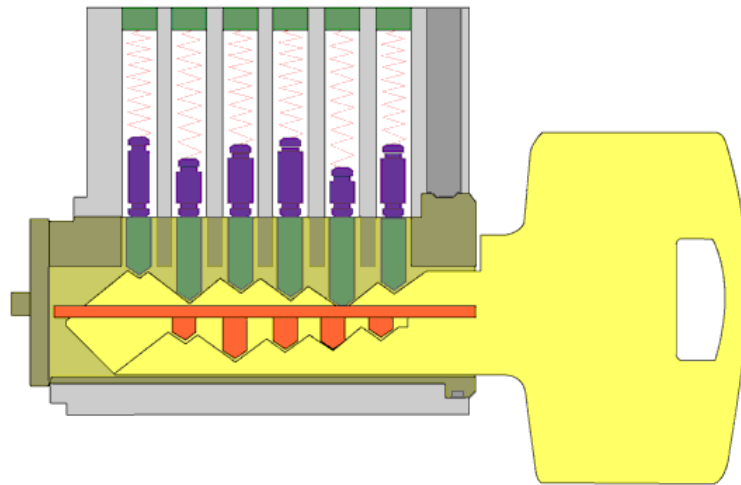


Figura 5. Esquema del mecanismo de acción de cerraduras.

Gracias a su alta especificidad de unión (principalmente para anticuerpos monoclonales), los inmunoensayos presentan una gran opción para análisis que requieren resultados rápidos dado que no necesitan de una extracción exhaustiva a comparación con otras matrices, en la orina, el suero y la saliva pueden emplearse de forma directa sin la necesidad de realizar hidrólisis o extracciones orgánicas [42].

En la actualidad existen varios tipos de inmunoensayos dentro de los que destacan los radioinmunoensayos (RIA), los inmunoensayos enzimáticos (EIA, EMIT, CEDIA, ELISA), los inmunoensayos de polarización de fluorescencia (FPIA) y los inmunoensayos de cinética de micro partículas (KIMS).

2.1. Inmunoensayos enzimáticos (EIA, Enzyme Immunoassay).

Los ensayos EIA involucran el uso de enzimas en lugar de isótopos radiactivos para identificar al compuesto de interés en una muestra. La identificación de los complejos Ag-Ac, se hace mediante enzimas unidas al antígeno, o bien, unidas al anticuerpo [68]. Como se muestra en Figura 6, estas pruebas utilizan la acción catalítica de las enzimas, de esta manera, las uniones enzimáticas con sustratos relevantes se usan para generar productos finales con fluorescencia, color e inclusive con luminiscencia que pueden ser ópticamente identificables o medidos.

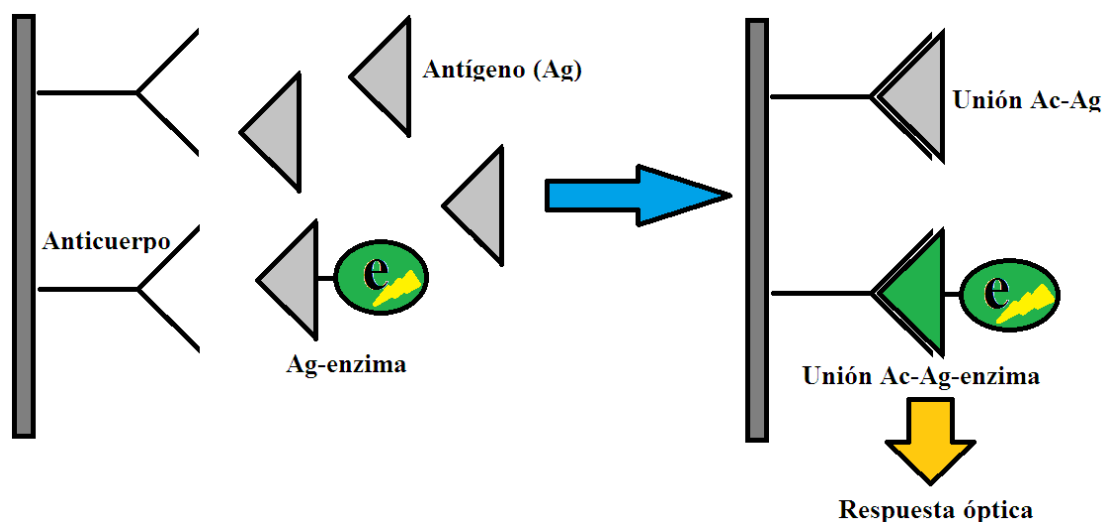


Figura 6. Esquema de una reacción inmunoenzimática tipo EIA.

Al reaccionar el anticuerpo con el antígeno específico unido a una enzima determinada, se obtiene un complejo con una respuesta óptica que puede identificarse o medirse

Las moléculas de las enzimas pueden inducir o incrementar las reacciones entre Ac-Ag lo que se traduce como un aumento en la sensibilidad y la efectividad de la prueba comparada con el resultado de uniones producidas por reacciones simples sin catálisis. Sin embargo, la sensibilidad de los ensayos es limitada por los detectores fotométricos empleados para la medición cuantitativa de los productos de la reacción, por lo cual, su empleo queda suscrito principalmente a pruebas de tamizaje o presuntivas.

Las uniones enzimáticas pueden producir varios tipos de señales, que dependen del sustrato en el que se encuentran presentes. La manera más sencilla de identificar sustancias de abuso comunes es a través de este tipo de pruebas en las que pueden emplearse espectrofotómetros para medir la señal colorimétrica generada por las enzimas. Por otro lado, los inmunoensayos enzimáticos comerciales solamente arrojan señales colorimétricas que suelen ser indicativas de la presencia de la sustancia en la muestra, sin presentar la posibilidad de realizar una medición cuantitativa sobre la señal obtenida. Algunas enzimas comúnmente empleadas en los ensayos EIA son la G6PDH (Glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa), peroxidasa de rábano y β -galactosidasa [67].

2.2. Multiensayo enzimático (EMIT, Enzyme Multiplied Immunoassay Technique).

Este tipo de inmunoensayo se aplica ampliamente, al igual que los anteriores, en la detección de sustancias de abuso con el fundamento de enlazar a la sustancia con una enzima que puede ser lisozima, β -galactosidasa o la G6PDH. Como se observa en la Figura 7, cuando este complejo se une a un anticuerpo, la enzima se inactiva, pero cuando el anticuerpo reacciona con un antígeno, la enzima queda libre y puede hidrolizar determinados sustratos, ocasionando un incremento en la actividad enzimática que se manifiesta como un cambio en la densidad óptica (DO) de las soluciones, dando una señal identificable, por ejemplo, un cambio de coloración [69].

La modificación en la densidad óptica se da por un cambio en la absorbancia, por ejemplo en el caso de la G6PDH a 340 nm, debida a la reducción de la coenzima NAD^+ a la coenzima NADH gracias a la acción de la G6DPH. Este es un sistema homogéneo competitivo basado en la concentración de la sustancia en la muestra, la cual es directamente proporcional al cambio en la magnitud en la absorbancia.

Cuando en la muestra analizada no existe la presencia del antígeno específico, la densidad óptica de la muestra no presenta cambios, indicando poca o ninguna actividad enzimática, teniendo en ese momento un resultado negativo para el inmunoensayo.

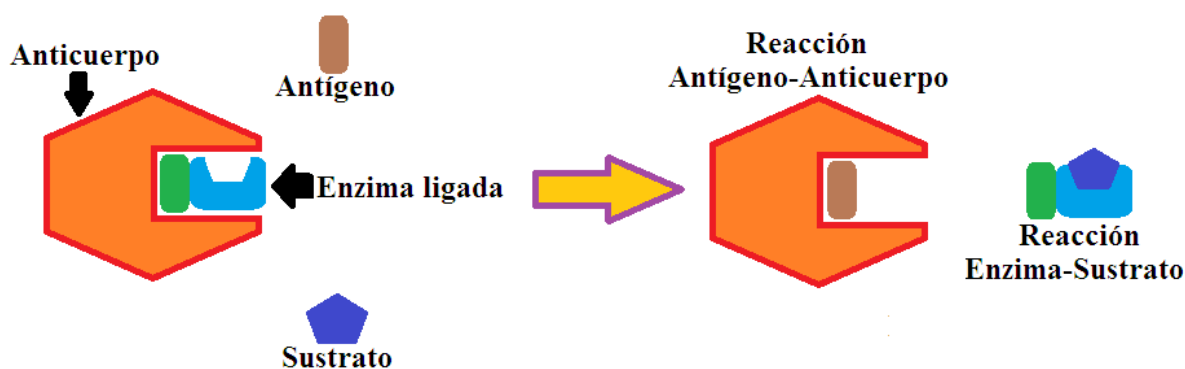


Figura 7. Representación esquemática de los inmunoensayos EMIT.

2.3. Inmunoensayo de donador enzimático clonado (CEDIA, Cloned Enzyme Donor Immunoassay).

Los ensayos tipo CEDIA son similares a los ensayos EMIT ya que también son inmunoensayos en fase homogénea y competitivos con la diferencia de que, tal cual su nombre lo indica, los inmunoensayos de donador enzimático clonado, emplean dos fragmentos complementarios de la enzima, comúnmente la β -galactosidasa es la enzima de selección. Las dos unidades o fragmentos de la enzima tienen funciones contrapuestas, esto es, un fragmento actúa como donador (ED, Enzyme Donor unit), mientras que el otro fragmento actúa como receptor (EA, Enzyme Aceptor unit). Aunque estos fragmentos se encuentran inactivados, al ser introducidos en la muestra o la solución de análisis, se re-ensamblan y activan para poder reaccionar con el sustrato específico. La unidad donadora de la enzima compite con el analito de la muestra por la unión con el sitio activo del anticuerpo, de esta manera, cuando uno de los fragmentos se une al anticuerpo no puede complementarse con el otro fragmento, por lo tanto la enzima no es activa. Cuando existe el xenobiótico específico en la muestra, éste se enlaza al anticuerpo, la enzima se completa y actúa sobre el sustrato, produciendo un cambio de coloración que dependiendo del control de variables del ensayo, puede ser medible o simplemente identificable [69].

Es preciso tener claro que dado la complejidad de las circunstancias en los casos judiciales, el analista no tiene el control de todas las variables como se realizaría en estudios clínicos, por lo cual, los inmunoensayos son, en forma general, empleados como pruebas de orientación, no de cuantificación, tomando las señales coloridas como un indicador de la presencia del analito, sin medir dicha señal con fines cuantitativos.

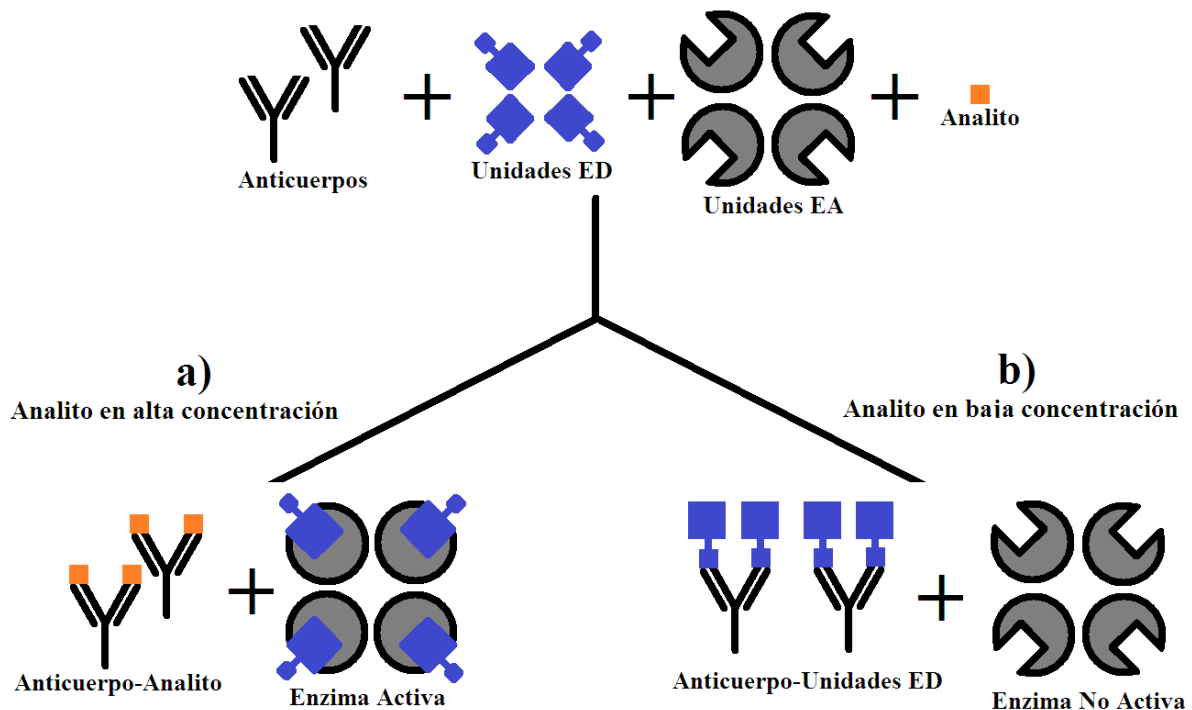


Figura 8. Representación esquemática de los inmunoensayos CEDIA.

En a) la unión entre el analito (xenobiótico) y el anticuerpo, permite que la enzima se complete y por tanto se active; mientras que en b) la unión entre el anticuerpo y la unidad donadora ocasionan que no se pueda realizar la activación correspondiente de la enzima.

2.4. Inmunoensayos Enzimáticos ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay).

Los análisis tipo ELISA son inmunoensayos heterogéneos que se basan en la premisa de que luego de acoplar antígenos solubles o anticuerpos a una matriz sólida insoluble, éstos retienen la actividad inmunológica y en que estas biomoléculas también pueden unirse a una enzima, reteniendo el conjugado

resultante, tanto la actividad enzimática como inmunológica. Como enzimas se suelen utilizar la peroxidasa, la galactosidasa o la glucosa oxidasa [68].

En los ensayos ELISA, según se observa en el paso 3 de la Figura 9, siempre se realiza una separación entre el inmunocomplejo formado sobre la fase sólida y las biomoléculas que no se fijan. Esta separación puede hacerse por simple aspiración y lavado, lo que permite eliminar todos los componentes de la muestra que podrían interferir en el ensayo. La separación entre los inmunorreagentes libres y fijados puede hacerse también por sedimentación, captura de los inmunocomplejos de interés, filtración, difusión radial y otros principios inmunocromatográficos que han servido de base a ensayos rápidos, sencillos y que no requieren equipamiento, muy apropiados para el diagnóstico individual. No obstante, los lavados continúan siendo el procedimiento de elección y son necesarios entre cada paso de reacción, lo que obstaculiza la automatización.

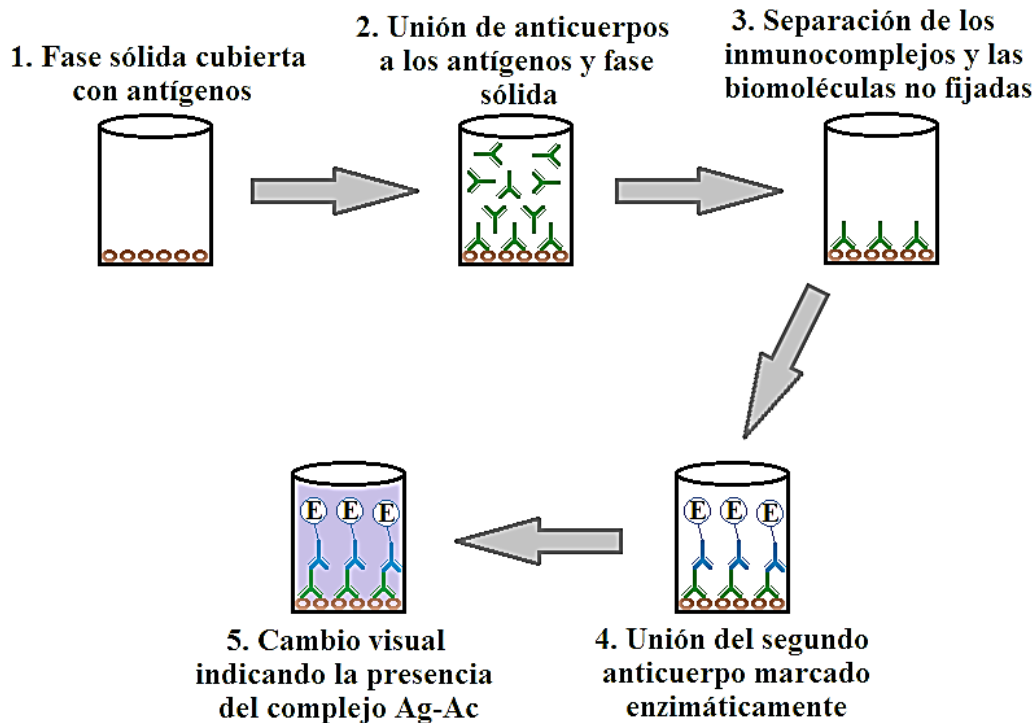


Figura 9. Esquema de una reacción ELISA Indirecta.

En los ensayos indirectos o competitivos la confirmación de la presencia del complejo Ag-Ac1 específico se realiza por medio de un anticuerpo secundario marcado enzimáticamente (Ac2-E), para generar una señal óptica al producir el inmunocomplejo Ag-Ac1-Ac2-E.

Además de haptenos, en el ELISA también es posible determinar moléculas de alto peso molecular. Sin embargo, su principal ventaja está dada en su alto grado de sensibilidad, detectabilidad, precisión y exactitud, lo que hace que los inmunoensayos enzimáticos según el principio ELISA, puedan equipararse a los radioinmunoensayos, sin sus desventajas [70].

Existen tres tipos de pruebas ELISA, sándwich, competitivos (inhibición de antígeno e inhibición de anticuerpo) y no competitivos (captura de anticuerpo y captura de antígeno) [68][70].

3. Pruebas colorimétricas.

Cuando los xenobióticos se encuentran en concentraciones altas y en ausencia de compuestos que interfieran con ellos, dan lugar a reacciones coloridas características con reactivos apropiados. Algunos de estas pruebas son prácticas, rápidas, económicas y sencillas; sin embargo, la mayoría de ellas identifica ciertos grupos funcionales que pueden estar presentes en otros compuestos también o que al presentar grupos funcionales similares pueden también reaccionar y dar interferencia con la identificación de los xenobióticos y sus metabolitos.

Estas pruebas suelen estar basadas en reacciones de color y cubren un número importante de xenobióticos; no obstante, la descripción del color suele ser muy subjetiva ya que las personas con visión normal suelen ver los colores producidos con distinta intensidad. Muchos de estos ensayos suelen realizarse satisfactoriamente en tubos de vidrio limpios, cápsulas de porcelana o placas de toque y tiras reactivas. Estas últimas permiten minimizar los volúmenes de reactivos y la muestra necesaria.

Cuando se realizan los ensayos de color es importante analizar conjuntamente con la muestra un blanco de reactivo y un testigo positivo. Por ejemplo, si la muestra es orina, el blanco y testigo se preparan sobre la misma matriz [71].

Existe una gran variedad de técnicas empleadas principalmente para evidenciar la presencia de sustancias de abuso, por otro lado, para la identificación de xenobióticos como metales pesados o plaguicidas la cantidad de pruebas de tipo colorimétrico son significativamente reducidas; para este tipo de sustancias se emplean técnicas de análisis espectroscópicas o cromatográficas (TLC, Cromatografía de Gases, Cromatografía Líquidos, Absorción Atómica, etc.) como pruebas presuntivas o de orientación.

Por esta razón, las pruebas colorimétricas que se presentan en la primera sección de este tema están enfocadas en evidenciar la presencia de sustancias de abuso en diversas matrices como la sangre, orina, contenido gástrico/vómito, entre otras [71].

Cuando las pruebas se aplican a extractos analíticos existe una pre-selección del reactivo o reacción a emplear en función de las características del extracto. La clasificación se muestra a continuación:

- Ensayo o reactivo para **extractos ácidos**.
 - ⚗ Tricloruro Férrico (acidez alta o baja).
 - ⚗ Folin-Ciocalteu (acidez alta o baja).
 - ⚗ Liebermann (acidez alta o baja).
 - ⚗ Nessler (acidez alta o baja).
 - ⚗ Diazotación (acidez baja).
 - ⚗ Koppanyi-Zwicker (acidez baja).

- Ensayos o reactivos para **extractos neutros**.
 - ⚗ Koppanyi-Zwicker.
 - ⚗ Liebermann.
 - ⚗ Nessler.

- Ensayos o reactivos para **extractos básicos**.
 - ⚗ P-Dimetilaminobenzaldehído.
 - ⚗ Cloruro Férrico.

- 🧪 Formaldehído-sulfúrico.
- 🧪 Forrest.
- 🧪 FPN (Cloruro de hierro III: ácido perclórico: ácido nítrico).
- 🧪 Liebermann.
- 🧪 Mandelin.
- 🧪 Marquis.
- 🧪 Nessler.

Según el grupo funcional que se desee evidenciar pueden emplearse las siguientes reacciones:

Tabla 7. Ensayo o reactivo a emplear según el grupo funcional.

Grupo Funcional o Grupo de Sustancias	Ensayo o Reactivo
Salicilatos	Tricloruro férrico Trinder
Fenotiazinas	Formaldehído-sulfúrico FPN
Hidrocarburos halogenados	Fujiwara
Paraquat/diquat	Ditionito de Sodio
Imipramida (similares)	Forrest
Bases nitrogenadas y alcaloides	Dragendorff
Paracetamol, Fenacetina	o-Cresol-Amoniaco
Amidas (alifáticas)	Nessler
Anfetaminas	Ninhidrina
Metanfetaminas	Simon
Antidepresivos	Marquis
Barbitúricos	Zwicker Koppanyi-Zwicker
Benzodiacepinas	Formaldehído-sulfúrico
Cannabis	Duquenois
Carbamatos (no aromáticos)	Furfuraldehído
Cocaína	Tiocianato de cobalto p-Dimetilaminobenzaldehído

	Mandelin Scott
Ditiocarbamatos	Nitroprusiato de sodio
Imidas	Koppanyi-Zwicker
Cetonas	Nitroprusiato de sodio
Anillos piridínicos Monosustituídos	Bromuro de cianógeno
Nitratos y nitritos	Sulfato ferroso
Alcaloides	Bouchardat Valser-Mayer Dragendorff
Agentes oxidantes	Difenilamina
Aminas aromáticas 1 ^{as}	Diazotación
Aminas aromáticas 1 ^{as} 2 ^{as}	Simon Dragendorff
Aminas alifáticas 3 ^{as} 4 ^{as}	Dragendorff
Agentes reductores	Benedict

A continuación se presenta una breve descripción general de algunas de las pruebas colorimétricas. La omisión de alguna sustancia no indica que no presente respuesta positiva en el ensayo. Es importante controlar cada reacción con un blanco de reacción y un positivo de la reacción, **ambos en la misma matriz de análisis**.

3.1. Benedict.

El resultado positivo de esta prueba arroja una coloración roja debida a la formación de óxido cuproso por la presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico, ditionitos, entre otras sustancias reductoras.

La preparación de este reactivo se realiza disolviendo 1.73 g de sulfato de cobre en 10 mL de agua (destilada). De forma independiente, disolver 1.73 g de citrato de trisodio y 10 g de carbonato de sodio anhidro en 80 mL de agua (realizar

con precaución, la reacción es exotérmica). Mezclar las dos soluciones y llevar a aforo a 100.0 mL.

Para llevar a cabo el ensayo, se agregan 0.5 mL del reactivo a la muestra (orina, contenido gástrico, restos del lugar de la investigación o polvo blanco). Calentar a baño maría durante 3 min.

3.2. Bouchardat

Esta prueba arroja un precipitado de coloración castaño pardo que puede distinguirse sobre un fondo de contraste blanco al reaccionar con alcaloides.

Para su preparación se disuelve 1 g de yoduro de potasio (KI) en la menor cantidad posible de agua destilada y agregar 0.5 g de yodo elemental (I_2). Una vez disuelto el yodo, llevar al aforo a 100.0 mL con agua destilada.

Se adicionan 0.5 mL del reactivo a la muestra y se calienta en baño maría durante 3 minutos.

3.3. Diazotación.

Obtener un color rojo brillante o naranja tras realizar esta prueba indica la presencia de una amina aromática primaria. Existen algunas aminas aromáticas que dan falso negativo en esta prueba, por ejemplo, la difenilamina no da la reacción, mientras que el aminonitrotiazol (sólido) da una coloración violeta.

NOTA: Las pruebas colorimétricas incluidas en la sección 3 del presente capítulo del manual fueron seleccionadas por ser algunas, no todas, de las más empleadas dentro del área de análisis toxicológicos realizadas en laboratorios de baja complejidad que no disponen de los medios necesarios para realizar pruebas de confirmación de mayor validez. Las técnicas aquí listadas fueron consultadas de las referencias [30], [69] y [71], siendo la referencia [71] la más significativa para dicha sección.

La preparación de este ensayo, a diferencia de las reacciones anteriores, se realiza *in-situ* sin previa síntesis del reactivo necesario. Se agrega muestra a analizar en ácido clorhídrico 2M y se observa sobre un fondo de contraste blanco, se agrega una gota de nitrito de sodio (realizar con sumo cuidado ya que el nitrito de sodio presenta reacciones explosivas y exotérmicas), posteriormente agregar una gota de 2-naftol en hidróxido de sodio 2M.

3.4. Dicromato de Potasio.

Un resultado positivo en esta prueba se obtiene al observar un cambio en el color de naranja (Cr^{VI}) al verde (Cr^{III}) indicando la presencia de sustancias volátiles reductoras. Si se obtiene un resultado positivo se debe llevar a cabo un ensayo cuantitativo para etanol, metanol, acetaldehído o paraldehído en sangre que son los principales agentes reductores volátiles que se encuentran en los análisis toxicológicos.

Para preparar el reactivo se disuelven 3.75 g de dicromato de potasio en 150 mL de agua destilada (calentar si es necesario). A continuación se agregan 280 mL de ácido sulfúrico concentrado (agregar lentamente bajo agitación continua), manteniendo el recipiente en un baño de hielo. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se completa el volumen de disolución hasta alcanzar 650 mL con agua destilada. Cuando se emplea el reactivo como revelador en cromatografía en capa fina, la solución se prepara disolviendo 12.5 g de dicromato de potasio en 500 mL de ácido sulfúrico.

Agregan 0.5 mL del reactivo a la muestra y calentar en baño maría durante 3 minutos para observar un cambio de coloración. Pueden emplearse como prueba colorida a través de papel filtro al cual se le agregan 50 μl de dicromato de potasio en forma de tira, se inserta el papel en el cuello del tubo que contiene 1 ml de la orina, se tapa ligeramente el tubo y se calienta en agua hirviendo por 2 minutos.

3.5. Difenilamina.

Un resultado de color azul en la interfase indica la presencia de agentes oxidantes como bromatos, cloratos, cromatos, dicromatos, yodatos, plomo (IV), manganeso (III, IV, VII), nitrato, nitrito, permanganato o vanadato. Un color azul ligero se observará en la mayoría de las muestras del contenido estomacal debido a la presencia de material orgánico. Como los agentes oxidantes fuertes se reducen rápidamente en las muestras biológicas, la prueba debe realizarse lo más rápido posible después de recibida la muestra.

Para su preparación se disuelven 10 g de difenilamina en 1 L de ácido sulfúrico concentrado.

Para su aplicación es necesario filtrar, 5 ml de contenido estomacal en un tubo de ensayo de 12X75 o de 13X100. Agregar 0.5 ml del filtrado o del residuo recolectado en el lugar de la investigación en un tubo limpio y lentamente agregar 0.5 ml de solución de difenilamina por las paredes del tubo de tal manera que se forme una capa por debajo de la muestra evitando que se mezclen ambos líquidos.

3.6. Ditionito de Sodio.

Obtener una coloración azul fuerte indica la presencia de paraquat; el diquat da un color amarillo-verdoso que es apantallado por la presencia de paraquat. Si el color se pierde con la agitación continua y es restaurado agregando el ditionito de sodio se infiere la presencia de paraquat (Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) o el diquat (dibromuro de 1,1'-etilen-2,2'-bipiridilo), ambos empleados como herbicidas.

La reacción de esta prueba se realiza *in-situ*, se agrega 0.5 mL de hidróxido de amonio 2M a 1 mL de muestra, mezclar por al menos 5 segundos y agregar 20 mg de ditionito de sodio.

3.7. Dragendorff.

Se emplea para indicar principalmente alcaloides, aminas aromáticas primarias y secundarias, así como aminas alifáticas terciarias y cuaternarias, originando un color naranja para las aminas y rojizo para los alcaloides.

Para su preparación se disuelven 8 g de subnitrito de bismuto (nitrito básico de bismuto) en 20 ml de ácido nítrico 10 N (se prepara mezclando 20 ml de nítrico concentrado con 50 ml de agua destilada). Agregar esta solución a una disolución que contenga 22.7 g de yoduro de potasio en la menor cantidad posible de agua (entre 20 y 25 mL). Dejar en reposo para decantar el nitrito de potasio para separar y aforar a 100 mL.

Para la realización de la prueba, se agregan 0.5 mL del reactivo a la muestra y se calienta en baño maría durante 3 minutos.

3.8. Folin–Ciocalteu.

Obtener un color azul indica la presencia de compuestos fenólicos, sin embargo, la reacción se inhibe en presencia de halógenos unidos al núcleo fenólico.

Para la preparación del reactivo se disuelven 100 g de tungstato de sodio y 25 g de molibdato de sodio en 800 mL de agua destilada. Agregar 50 mL de ácido fosfórico y 100 mL de ácido clorhídrico. Dejar en reflujo por 10 h. Dejar enfriar, agregar 150 g de sulfato de litio, 50 mL de agua y 4-6 gotas de bromuro, dejar que se estabilice por 2 horas. Calentar a baño maría por 15 minutos para remover el exceso de bromuro, enfriar, filtrar y aforar a 1.0 L con agua destilada (NOTA: Se debe mantener a 4° C y usarla durante los 4 meses posteriores a su preparación. No usar si posee una coloración verdosa. Para usarla se debe realizar una dilución en agua destilada 50:50)

Para realizar la prueba se necesita el reactivo Folin-Ciocalteu y solución acuosa de hidróxido de sodio (2 M). Diluir 1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu con

2 mL de agua destilada y agregar 1 mL de orina. Agregar 1 mL de solución acuosa de hidróxido de sodio y mezclar en vortex por 5 segundos.

3.9. Formaldehído-sulfúrico.

Esta prueba arroja un resultado positivo en presencia de benzodiazepinas mostrando una coloración comúnmente naranja con excepción de bromazepam y clozapina que arrojan un color amarillo, mientras que con flurazepam se obtiene un color rosado. Para esta prueba se obtienen resultados de falsos positivos coloridos con fenotiazinas, tetraciclinas y tioxantenos.

Para la preparación del reactivo es necesario agregar ácido sulfúrico a formaldehído en proporción 4:6 v/v ($H_2SO_4:CH_2O$). Se debe realizar esta mezcla en un baño de hielo y si el reactivo se enturbia es necesario calentar a baño maría hasta eliminar la turbidez.

Para realizar la prueba se agregan volúmenes equivalentes de muestra y del reactivo, y se procede a calentar a 100 °C durante un minuto.

3.10. Forrest.

Esta prueba rinde los mejores resultados en matriz de orina y en desproteinizado de sangre para antipsicóticos de primera y segunda generación como la imipramina y los compuestos relacionados con su estructura. Al reaccionar con estos compuestos se observa una coloración que puede ser amarillo, verde oscuro o claro y algunos tonos azulados.

Para preparar el reactivo de Forrest es necesario mezclar 25 mL de solución acuosa de dicromato de potasio (2 g/L), 25 mL de solución acuosa de ácido sulfúrico (300 mL/L), 25 mL de ácido perclórico (200 g/Kg) y 25 mL de solución de ácido nítrico (500 mL/L).

Para realizar la prueba se agregan 0.5 mL de muestra a 1 mL del reactivo de Forrest y mezclar homogéneamente durante al menos cinco segundos.

3.11. FPN (Cloruro de hierro III: ácido perclórico: ácido nítrico).

Esta prueba está diseñada para probarse principalmente en orina la cual presenta un cambio de coloración de rosa a rojo, naranja, violeta o azul cuando existe la presencia de fenotiazinas.

Para preparar el reactivo se mezclan 5 mL de solución acuosa de cloruro férrico (50 g/L), con 45 mL de solución acuosa de ácido perclórico (20% m/m), y 50 mL de solución de ácido nítrico (50% v/v).

Para realizar la prueba, a 1 mL de orina se le agrega 1 mL del reactivo y se mezcla por al menos cinco segundos.

3.12. Fujiwara.

Es factible aplicar esta prueba principalmente en orina y desproteinizado de sangre, matrices en las cuales, un resultado positivo de la reacción es la obtención de un color rojo o púrpura en las capas superiores de las disoluciones (piridina), provocadas por la presencia de un compuesto que posee al menos dos átomos halogenados unidos a un carbono, por ejemplo, el cloroformo, tetracloruro de carbono, hidrato de cloral, DDT, ácido tricloroacético e hidrocarburos policlorados.

En esta prueba la reacción se realiza *in-situ* para lo cual se preparan tres tubos de ensayo de 10 mL bien rotulados (**a**, **b**, **c**). En el tubo **a** se coloca 1 mL de la muestra (orina o desproteinizado de sangre), en el tubo **b** se coloca 1 mL de orina o suero libre de compuestos halogenados para actuar como blanco (en caso de no contar con las matrices libres, puede emplearse agua destilada como blanco), y en el tubo **c** se coloca 1 mL ácido tricloroacético diluido como testigo positivo de la reacción. A cada tubo se le agrega 1 mL de hidróxido de sodio y 1 mL de piridina. Se mezclan las soluciones **cuidadosamente** y se procede a calentar en baño de agua hirviendo durante 2 minutos.

3.13. Yodoplatínico.

Un resultado positivo de esta prueba es la aparición de un precipitado de color azul-violeta, marrón violeta o gris-violeta, lo que indica la presencia de un compuesto alcaloide. En presencia de aminas terciarias y cuaternarias se obtienen colores más claros, mientras que las aminas de bajo peso molecular no presentan reacciones coloridas.

Para preparar este reactivo se disuelven 0.25 mg de cloruro de platino IV (tetracloruro de platino), en y 5 g de yoduro de potasio en agua destilada. Posteriormente aforar a 100.0 mL.

Para realizar la prueba se disuelve la muestra en 2 gotas de ácido clorhídrico 2M, se agregan 2 o 3 mL del reactivo y se diluye a un volumen total de 10 mL con agua destilada.

3.14. Koppanyi-Zwicker.

Las sustancias que contienen estructuras de imidas, es decir, que el anillo contiene enlaces C=O y N-H, por ejemplo los barbitúricos, dan productos de reacción de color violeta. Las sulfonamidas y otros compuestos con anillo libre, por ejemplo furosemida y tiazidas, con grupo $-SO_2-R$ en una cadena como la clopropamina, con grupo $-SO_2NH_2$ uniendo a un grupo bencénico a otro anillo como el sulfametoxazol, dan un color rosado o rojo-violeta.

Para la preparación de este reactivo se prepara una disolución de nitrato de cobalto en etanol al 1% (m/v).

Para realizar la prueba se disuelve la muestra en 1 mL de etanol, se agrega una gota del reactivo y posteriormente se adicionan 10 μ L de pirrolidina y se agita hasta observar la aparición del color.

3.15. Liebermann.

Una prueba positiva se observa al obtener como resultado de la reacción un color naranja que es producido por sustancias que contienen un anillo bencénico monosustituído no unido a C=O, N-(C=O)-Ar un anillo que contiene el grupo C=N-O-Ar. El color marrón es dado por sustancias que contienen 2 anillos bencénicos monosustituídos. También una amplia gama de colores se producen por compuestos que contienen grupos: -OH (alcoholes), R-O-R (éteres) y grupos aldehído unidos a un anillo bencénico o a un anillo policíclico que contiene un anillo bencénico.

Para la preparación del reactivo de Liebermann se mezcla 1 g de nitrito de sodio con 10 mL de ácido sulfúrico en baño de hielo y en la campana ya que libera humos tóxicos color marrón.

Para realizar la reacción se adicionan 0.5 mL del reactivo a la muestra y se calienta en baño maría durante al menos tres minutos.

3.16. Mandelin.

Esta prueba presenta diferentes colores según la sustancia que se esté buscando en la muestra. Para codeína se observa resultados color verde, para estricnina color violeta y para metadona color verde-azulado.

El reactivo de Mandelin se prepara disolviendo 0.5 g de vanadato de amonio en 100 mL de ácido sulfúrico concentrado y siempre se debe mezclar homogéneamente antes de usar.

Para la prueba se agregan 0.5 mL del reactivo a la muestra y se calienta en baño maría durante al menos tres minutos.

3.17. Marquis.

Esta prueba permite identificar una gran cantidad de sustancias. Por lo general los resultados presentan colores violetas o marrones en los cuales la

intensidad del color observado disminuye según la estructura del compuesto. Los anillos heterocíclicos sulfúricos (con o sin aromaticidad) presentan la mayor intensidad, seguidos de los anillos heterocíclicos con oxígeno (con anillo aromático), y finalmente los compuestos aromáticos con la menor intensidad. Un cambio de color naranja a color pardo indica la presencia de anfetamina, amitriptilina o nortriptilina. Para la codeína y morfina se observa un color violeta de intensidad media. Como revelador en CCF la amitriptilina, nortriptilina y efedrina presentan manchas color marrón, mientras que la desipramina y la imipramina, presentan una coloración azul, por otro lado la atropina y lidocaína presentan un color rosado; la codeína, morfina y el dextropropoxifeno manchas violetas.

El reactivo de Marquis se prepara mezclando 1 mL de solución de formaldehído con 9 mL de ácido sulfúrico concentrado que debe prepararse al instante, antes de ser empleado. La inestabilidad del reactivo hace necesaria su preparación diariamente sin posibilidad de almacenamiento para un uso posterior.

Para realizar la prueba se coloca una pequeña cantidad de la muestra (1 a 2 mg de polvo o una o dos gotas si se trata de un líquido) en una placa de toques y se agrega el reactivo de Marquis gota a gota (no más de tres gotas). Para su empleo como revelador en CCF, dado que contiene ácido sulfúrico concentrado, no se recomienda una aspersion directa sobre la placa, sino la exposición a vapores del reactivo durante varios segundos.

3.18. Nessler.

Las tioamidas y amidas alifáticas producen colores marrón-naranja. La presencia de un anillo aromático disminuye la intensidad de la reacción. Un color negro es producido por sustancias que contienen grupos orto o para hidroxilo y sustancias que tienen un grupo aminosecundarios (R-NH-R), imina (HN=R), o tipo hidracina (R-NH-NH₂) y cadenas alifáticas. Algunos compuestos pueden calentarse a 100°C y se observa un oscurecimiento.

Para el reactivo de Nessler se pesan 15 g de yoduro de mercurio (II) en un vaso de precipitados, en otro vaso se disuelven 10 g de yoduro de potasio en 20

mL de agua destilada. Esta disolución se vierte en el vaso que contiene el yoduro de mercurio (II), disolver muy bien con agitación y en baño de hielo. En un matraz disolver 40 g de hidróxido de sodio en 300 mL de agua destilada en baño de hielo. Mezclar ambas soluciones y agitar hasta que se observe el máximo de precipitado amarillo, al final decantar y separar el exceso de sales.

Para la realización de la prueba se agregan 0.5 mL del reactivo a la muestra y se calienta en baño de hielo por tres minutos al menos.

3.19. Ninhidrina.

Para obtener un resultado positivo en la prueba debe observarse un color rosado-naranja indicando la presencia de anfetaminas. (NOTA: es una de las reacciones colorimétricas menos sensibles).

Para preparar el reactivo se disuelven 0.5 g de ninhidrina en 10 mL de ácido clorhídrico y posteriormente diluir a un volumen total de 100 mL con acetona. La inestabilidad del reactivo hace necesaria su preparación diariamente sin posibilidad de almacenamiento para un uso posterior.

Para realizar la prueba, se coloca una pequeña cantidad de la muestra (1 a 2 mg si es sólido o una o dos gotas si se trata de un líquido) en un papel de filtro y agregar una gota del reactivo. Calentar a 110°C sobre una plancha calefactora.

3.20. o-cresol.

La presencia de un color azul oscuro indica la presencia de acetaminofén (paracetamol), fenacetina o p-aminofenol.

El reactivo es una solución acuosa de o-cresol a una concentración de 10% (m/v).

Para realizar la prueba, a 0.5 mL de la muestra agregar 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado, calentar en baño de agua hirviendo por 10 minutos y enfriar. Agregar 1 mL de la solución de o-cresol a 0.2 mL del hidrolizado (solución

anterior) y 2 mL de solución de hidróxido de amonio para mezclar por 5 segundos al menos.

3.21. p-dimetilaminobenzaldehído (p-DMAB).

El color violeta es provocado por sustancias tales como alcaloides del ergot, dimetiltriptamina, psilocina y psicolocibina; mientras que el color rojo, que cambia a violeta si se diluye, se observa en presencia de algunos cannabinoides o indoles en los cuales el anillo del indol no está unido a otro anillo; finalmente, el color naranja, que cambia a violeta con la dilución, se observa en presencia de fenoles y aminofenoles.

La preparación del reactivo se logra al disolver 2.0 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 50 mL de etanol (95%) y 50 mL de ácido clorhídrico concentrado. La inestabilidad del reactivo hace necesaria su preparación diariamente sin posibilidad de almacenamiento para un uso posterior.

Para realizar la prueba se agregan 0.5 mL del reactivo a la muestra y se calienta en baño maría durante tres minutos al menos.

3.22. Parry-Koppanyi.

El reactivo de Parry-Koppanyi en presencia de barbitúricos da como resultado de la reacción un compuesto color rojo-violeta.

El reactivo de Parry-Koppanyi es una solución de nitrato de cobalto (II) en metanol al 1% (m/v). De forma independiente se necesita una solución de isopropilamina al 5% en metanol (v/v).

La prueba se realiza en placa de toques en la cual se colocan dos gotas de la muestra, se le agrega una gota de solución de nitrato de cobalto (II) y una gota de la solución de isopropilamina.

3.23. Permanganato de potasio.

La aparición de un color o precipitado castaño indica presencia de anestésicos locales y otros compuestos tales como tiobarbitúricos o barbitúricos de cadena larga insaturada. Como revelador para CCF presenta manchas de color amarillo para barbitúricos, anfetaminas, carbamazepina, anilina. Como revelador también puede emplearse el permanganato de potasio ácido para revelar clorhidrato de cocaína, efedrina y en revelado secuencial para plaguicidas organofosforados.

El reactivo es una solución acuosa de permanganato de potasio al 1% (m/v), mientras que el permanganato de potasio ácido es una solución al 1% (m/v) en ácido sulfúrico 0.25M.

Para realizar la prueba se coloca la muestra en un tubo de ensayo y se agrega ácido clorhídrico al 1% para posteriormente adicional gota a gota la solución de permanganato de potasio.

3.24. Simon.

La obtención de color azul indica aminas secundarias, por ejemplo, metanfetamina que da un intenso color azul, efedrina, MDMA o bases de aminas heterocíclicas no sustituidas y otras aminas secundarias. Las aminas primarias como la anfetamina, MDA y otras aminas primarias producen un color rosado que cambia lentamente a rojo cereza. Este ensayo puede utilizarse para diferenciar la metanfetamina de la anfetamina. La presencia de algunos agentes reductores puede dar falsos negativos.

Para esta prueba se requieren tres reactivos. El primero (solución A) es una solución acuosa de carbonato de sodio al 20% (m/v). El segundo reactivo es una solución etanólica de acetaldehído al 50% (v/v etanol: acetaldehído). El tercer reactivo es una solución acuosa de nitroprusiato de sodio al 1% (m/v). Posteriormente se mezcla el segundo reactivo con el tercero y se obtiene la solución B.

Para la prueba es preciso colocar una pequeña cantidad de la muestra (1 a 2 mg si es sólido o una o dos gotas si se trata de un líquido) sobre una placa de toque y se agrega una gota de la solución B (nitroprusiato y acetaldehído); finalmente se agrega una gota de la solución A (solución de carbonato de sodio).

3.25. Tricloruro férrico.

Los colores rojos, naranjas, verdes, azules, violetas o marrones indican la presencia de compuestos fenólicos, ácidos grasos o fenilpirazolina. Algunas fenotiazinas dan positivo este ensayo. Los salicilatos dan color violeta. Algunos compuestos fenólicos no dan la reacción si están en solución acuosa. La aspirina (ácido acetilsalicílico) no da la reacción, excepto que se hidrolice previamente en medio alcalino o ácido a salicilato.

El reactivo se prepara disolviendo 5 g de tricloruro férrico anhidro u 8.25 g de tricloruro férrico hexahidratado, en 100 mL de agua destilada.

Para realizar la prueba se agrega una alícuota pequeña de 1 mL del reactivo a la muestra o a una solución etanólica de la muestra.

3.26. Trinder.

Esta prueba sirve para identificar principalmente el salicilato proveniente de una hidrólisis alcalina o ácida del ácido acetilsalicílico. En presencia de salicilato se obtiene una coloración violeta indicando la presencia del compuesto en la matriz.

El reactivo se prepara disolviendo 40 mg de cloruro de mercurio (II) en 850 mL de agua destilada, posteriormente se adicionan 120 mL de ácido clorhídrico 1 M y 40 g de nitrato de hierro (III) hidratado. Finalmente, se diluye a un volumen total de 1000 mL con agua destilada.

El procedimiento para la orina difiere un poco de las demás muestras biológicas. Para la orina, a 2 mL de la muestra se agregan 100 µL del reactivo de Trinder y se mezclan durante 5 segundos al menos. Para las demás matrices, se requiere realizar una hidrólisis por calentamiento con ácido clorhídrico 0.5 M en un

baño de agua hirviendo por 2 minutos. Después de dejar enfriar, se neutraliza la solución con hidróxido de sodio 0.5 M y finalmente, a 2 mL de la muestra se le agregan 100 μ L del reactivo de Trinder y se mezclan durante 5 segundos al menos. En el caso de contenido estomacal y sangre, se debe centrifugar la muestra y emplear solamente la solución resultante de este proceso (el suero en el caso de la sangre).

3.27. Valsler-Mayer.

En esta prueba los alcaloides, clorhidrato de cocaína por ejemplo, dan resultados positivos al presentar un precipitado, dando mayor validez a la prueba cuando se obtienen resultados negativos.

El reactivo se logra preparar al saturar una solución de yoduro de potasio 10% (m/v), con un exceso de yoduro de mercurio (II).

La prueba se realiza en un tubo de ensayo o una placa de toques en la cual se depositan unas gotas de la muestra previamente disuelta en metanol y se agrega la cantidad suficiente del reactivo para observar el precipitado.

3.28. Zwikker.

Se observan resultados positivos con colores rojos o violetas para compuestos que contienen enlaces de tipo amida ($R-(C=O)-NH-R$) y de tipo cetona $R-(C=O)-R$.

El reactivo se consigue al mezclar 40 mL de una solución de sulfato de cobre al 10% (m/v) con 1 mL de piridina y agua destilada suficiente para completar un volumen total de 100 mL.

La prueba se realiza en tubo de ensayo. Se disuelve la muestra en metanol y se agrega la solución acuosa de sulfato de cobre y piridina.

4. Espectroscopía Infrarroja.

La espectroscopía infrarroja (IR) es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Como las demás técnicas espectroscópicas, puede utilizarse para identificar un compuesto o investigar la composición de una muestra. Por esta razón, la técnica se utiliza ampliamente en investigación, laboratorios de control de calidad de la rama farmacéutica e industrial, cosmetología, alimentos, química de polímeros, servicios periciales, etc.

Esta técnica se basa en la interacción de luz infrarroja con la materia y permite la identificación de los enlaces químicos presentes, en otras palabras, la técnica permite identificar los grupos funcionales presentes en un compuesto ya que cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, la vibración intramolecular con la misma frecuencia de la radiación, aumenta en intensidad, lo que genera señales que corresponden a las frecuencias de vibración de un enlace específico. Lo anterior significa que si la molécula recibe un haz de luz con la misma energía de vibración, entonces la luz será absorbida en un rango de intensidad característica para cada tipo de enlace atómico, de esta forma se puede identificar a la sustancia por los grupos funcionales que la constituyen y tener un primer acercamiento a la naturaleza del xenobiótico presente en la muestra biológica [72].

Tanto desde el punto de vista instrumental como de sus aplicaciones es conveniente dividir la región infrarroja en tres regiones denominadas infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR) e infrarrojo lejano (FIR). La gran mayoría de las aplicaciones analíticas clásicas de la espectroscopía infrarroja se basan en el empleo del infrarrojo medio ($4000\text{-}300\text{ cm}^{-1}$) y el infrarrojo cercano, que proporciona la posibilidad de convertir esta técnica en una técnica cuantitativa.

En la actualidad los equipos más empleados en estos análisis son los espectrómetros de infrarrojo con transformada de Fourier. La espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) es una técnica que permite analizar todas las longitudes de onda del espectro infrarrojo simultáneamente, ofreciendo un

método rápido y confiable para el análisis de muestras conteniendo una o más sustancias químicas. Esta ventaja permite el análisis de compuestos orgánicos, células y tejidos [73].

La obtención de espectros IR se puede llevar a cabo a través de las siguientes técnicas de medida[74]:

- **Transmisión:** en este método de medida la radiación IR atraviesa la muestra registrándose la cantidad de energía absorbida por la muestra. A partir de la comparación de la radiación registrada tras atravesar la muestra, con un experimento de referencia se obtiene el espectro IR. Esta técnica permite analizar, con los accesorios adecuados, muestras gaseosas, líquidas y sólidas. En caso de muestras sólidas, éstas se muelen junto con bromuro de potasio (KBr) en polvo (ópticamente transparente) y se prensa para obtener una pastilla delgada que se expone a la radiación infrarroja.
- **Reflectancia Difusa (DRI por sus siglas en inglés):** en esta técnica la radiación infrarroja es dispersada por la superficie de la muestra; posteriormente, la radiación infrarroja es recolectada y concentrada para ser recibida por el detector del equipo.
- **Reflexión Total Atenuada (ATR por sus siglas en inglés):** es una técnica en la que el haz IR se proyecta en un cristal de alto índice de refracción. El haz se refleja en la cara interna del cristal y crea una onda evanescente que penetra en la muestra. Ésta debe estar en íntimo contacto con el cristal. Parte de la energía de la onda es absorbida y la radiación reflejada (con la información química de la muestra) es conducida al detector. Se trata de un método muy versátil que permite la medida de muestras líquidas y sólidas sin prácticamente preparación de las mismas.

De esta manera, el espectro IR de una muestra es una gráfica de la cantidad de energía IR (eje y), que es absorbida a determinadas frecuencias expresadas como número de onda cm^{-1} (eje x), en la región IR del espectro electromagnético (Figura 10).

Dicho lo anterior, la espectroscopía infrarroja presenta una opción rápida, sencilla y no destructiva para realizar pruebas presuntivas a extractos obtenidos tras el tratamiento de la muestra a analizar, en la cual, dependiendo de la concentración del analito, podrá identificarse cualitativamente la sustancia desconocida u obtener información importante sobre los grupos funcionales contenidos por la sustancia.

Algunos autores mencionan la posibilidad de realizar estudios de cuantificación por medio de ésta técnica, sin embargo, es preciso mencionar que para conseguir este objetivo la muestra a analizar debe contar con varias características entre las cuales se encuentran la pureza de la sustancia y la concentración del analito.

Estas características limitan en gran medida su aplicación en la toxicología forense ya que un gran número de casos deben ser manejados con la mínima información disponible, tanto de los hechos acontecidos, como de la sustancia que se pretende encontrar. De esta manera, al no conocer la naturaleza de la sustancia, no es posible aplicar métodos de purificación específicos para cada muestra dejando el riesgo latente de interferencias o resultados poco certeros al cuantificar la sustancia. Por otro lado, si las concentraciones de la sustancia no son las adecuadas (de acuerdo con el equipo disponible), las bandas obtenidas en el espectro no tendrán la resolución necesaria para poder hacer una diferenciación entre varias sustancias, mostrando de esta forma poca o nula selectividad para la cuantificación, de tal modo que la técnica tiene empleo únicamente como prueba presuntiva en análisis toxicológicos.

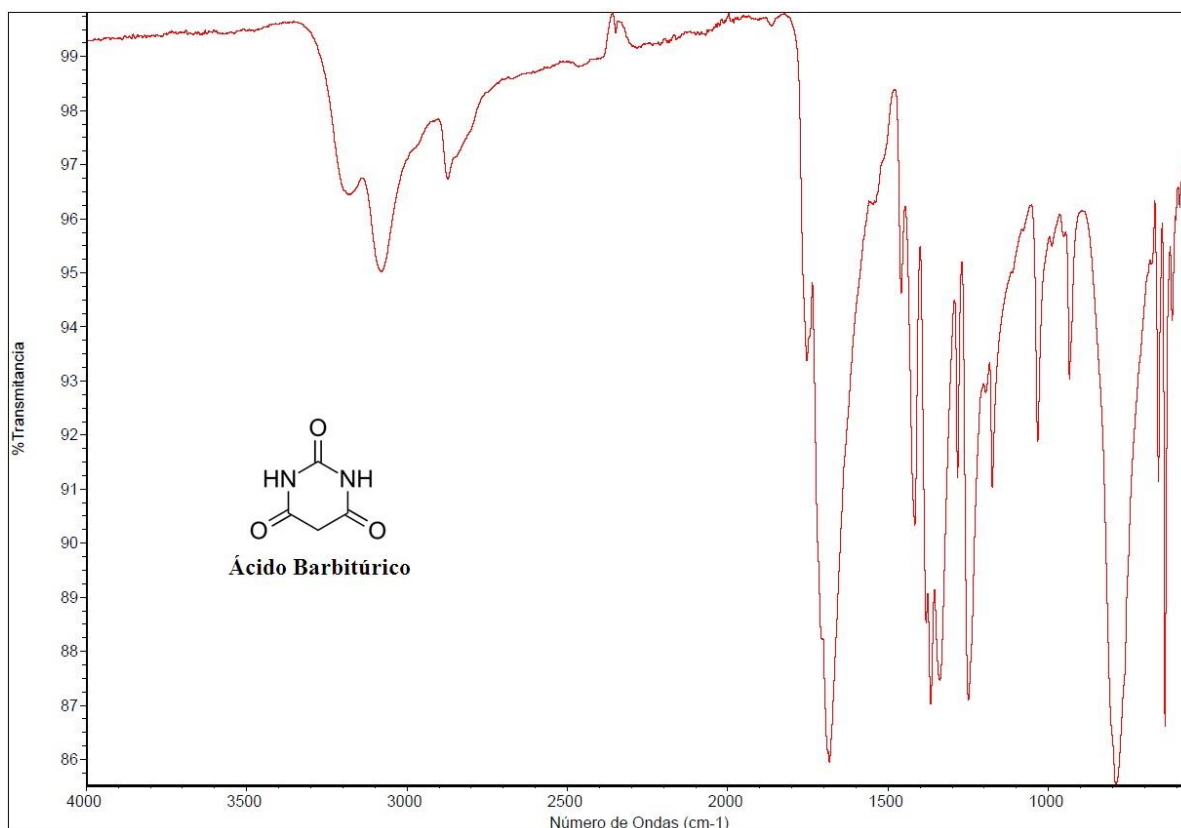


Figura 10. Espectro IR de Ácido Barbitúrico con bromuro de potasio (KBr) como blanco a través de ATR.

5. Espectrofotometría UV-Visible.

El principio en el que se basa esta técnica de análisis químico es en la absorción de la radiación electromagnética de las regiones ultravioleta y visible por la muestra que se analiza, es decir, la espectroscopia UV-Visible estudia la capacidad de las moléculas orgánicas e inorgánicas de absorber radiaciones específicas que contienen la energía requerida para llevar a estas moléculas a un estado de mayor energía (o estado excitado) [75].

Es importante aclarar que la región ultravioleta (UV), se subdivide a su vez en dos regiones que son: ultravioleta lejano que va de 0.6 a 190 nm y el ultravioleta cercano que abarca de 190 a 380 nm. A su vez, la región visible a la que es sensible el ojo humano, se localiza entre los 380 y 780 nm. De estas tres regiones, generalmente se emplean solamente la del ultravioleta cercano y la del visible ya

que los equipos e instrumental necesario para realizar mediciones en la región del ultravioleta lejano son sumamente complejas y difíciles de manejar [76].

Así pues, los equipos de análisis espectroscópico UV-Visible, detectan la cantidad de “luz” transmitida o absorbida a través de una solución problema contenida en una celda y la compara con la que se transmite o absorbe a través de una solución de referencia o “blanco”, que generalmente se trata del disolvente o la matriz en la cual se encuentra disuelto el analito.

Para que un compuesto orgánico presente una respuesta frente a este tipo de análisis debe contener dentro de su estructura, enlaces dobles conjugados, estructuras aromáticas o ambas. A estos grupos funcionales o estructuras que brindan el color a las disoluciones se les conoce como grupos cromóforos [75].

El empleo de esta técnica como análisis cualitativo en el área de la toxicología y la química forense se debe a que la absorbancia presenta un comportamiento lineal descrito por la “Ley de Lambert-Beer-Bourger (mejor conocida como la Ecuación de Lambert-Beer), ante concentraciones relativamente bajas en disoluciones acuosas. La mayoría de los equipos miden la transmitancia de la radiación en la disolución que posteriormente es expresada como Absorbancia y que es descrita por la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon \times l \times C$$

Donde **A**= Absorbancia, ϵ =Coeficiente de Absorción Molar, **l**=Longitud de la celda que contiene la disolución y **C**=Concentración de la disolución [76].

Este comportamiento es importante ya que el coeficiente de absorción molar (ϵ), es único para cada sustancia y puede emplearse como método de identificación en el área de análisis toxicológicos si pueden controlarse factores como la purificación de los extractos y la disposición de los valores de los coeficientes de absorción molar; sin embargo, al igual que en la espectroscopía IR, las variables que no pueden controlarse por la falta de información en cada caso y los factores que influyen en este tipo de análisis, proponen a la espectrofotometría UV-Visible como una opción poco viable frente a otros métodos presuntivos como los ensayos inmunológicos.

Ejercicio Práctico 5.

En función de su caso.

1. ¿Qué pruebas de orientación seleccionaría para sus muestras?
2. ¿Cuáles son los posibles falsos positivos y negativos de las pruebas que seleccionó?
3. ¿El tratamiento realizado durante su preparación es compatible con la prueba de orientación seleccionada?
4. En caso de ser negativa la respuesta anterior, ¿Qué procedimiento llevaría a cabo para poder realizar la prueba?
5. Comente sobre los alcances de la prueba que seleccionó.
6. ¿De cuántas pruebas consta todo análisis toxicológico?
7. Realice los cálculos necesarios para preparar los reactivos que empleará en sus pruebas de orientación.

Capítulo 5. Pruebas de Confirmación.

En el Capítulo 4 se abordaron las pruebas presuntivas que pueden emplearse como primer acercamiento a los análisis toxicológicos. Estas pruebas le sirven a los analistas como guía para tener un primer resultado sobre los posibles xenobióticos y sus metabolitos contenidos en la matriz de análisis de elección.

Una vez identificadas o no descartadas las sustancias que se buscan en la matriz de estudio a fin de determinar el agente causal de la intoxicación o la muerte por intoxicación, el siguiente paso dentro de los análisis toxicológicos es confirmar la identidad de la sustancia y proceder a su cuantificación para que estos datos puedan emplearse, según el interés de las sustancias en el proceso jurídico.

De esta forma, el presente capítulo se centra en mostrar las técnicas que se emplean para realizar dichas confirmaciones, recordando siempre que el método presuntivo y el método de confirmación no deben estar basados en el mismo principio para asegurar de esta manera que la información obtenida de dicho proceso analítico cubra los requerimientos para ser aceptados dentro del proceso legal en el que estén involucrados [30].

Así pues, a lo largo del capítulo se abordan métodos analíticos de separación (métodos cromatográficos) y métodos espectroscópicos, los cuales, en algunos casos están validados por organizaciones como UNODC para cierto tipo de sustancias.

Al igual que en los casos anteriores, la mayoría de los métodos han sido desarrollados para sustancias de abuso, compuestos orgánicos y procesos relacionados a este tipo de xenobióticos; sin embargo, también se presentan metodologías que son empleadas para sustancias inorgánicas como los metales pesados y sus sales.

Por otro lado, las metodologías de predilección en el ámbito legal son aquellas que tienen la posibilidad de ofrecer varias funciones, por esta razón, las técnicas que son planteadas de manera sencilla en el capítulo, pueden presentarse también como sistemas acoplados [51]. Un ejemplo de esto es el acoplamiento

entre técnicas de separación y técnicas espectroscópicas o espectrométricas, ofreciendo de esta manera la posibilidad de realizar cromatografías acopladas a espectrometrías de masas, obteniendo en conjunto, una identificación de la sustancia con mayor certeza y al mismo tiempo la posibilidad de realizar una cuantificación por alguno de los procedimientos planteados más adelante.

Como es de suponerse, dentro de las etapas de análisis, la etapa de confirmación y cuantificación representa la etapa de mayor importancia en todo el proceso ya que en este punto debe asegurarse la validez y credibilidad de los resultados que serán presentados en el dictamen toxicológico. Si bien es cierto que un error en las etapas anteriores influirá en el resultado final de la etapa de confirmación, un error en esta etapa del proceso analítico puede representar una pérdida total de información y por ende, la pérdida de la posibilidad de aportar información crucial para el proceso jurídico relacionado ya que existen muestras o matrices que son empleadas en su totalidad para subsidiar el análisis de confirmación y dado que las pruebas presuntivas no tienen la misma validez que las pruebas de confirmación, la información que puede aportar el toxicólogo sería nula en este caso.

Dicho lo anterior, es preciso recalcar que la elección sobre la técnica de confirmación debe ser realizada después de todo un estudio sobre la información disponible del caso, de la posible sustancia, si es que se cuenta con una sospecha de alguna o algunas en particular y, finalmente, de los recursos de los que se dispone para hacer dicho análisis, ya sea en cuanto al instrumental, los reactivos o el equipamiento.

Cuando se tiene como objetivo la identificación de alguna sustancia en particular, el proceso analítico debe desarrollarse de forma directa ya que tanto las pruebas presuntivas, como las pruebas de confirmación serán elegidas sólo en función de esta sustancia y la matriz de la que se dispone sin contemplar la presencia de otras sustancias; esto no implica que no existan otros xenobióticos o metabolitos en la matriz, sino que el enfoque pretende eliminar estas sustancias de interferencia durante los procesos de extracción del xenobiótico o sus metabolitos de la matriz [77]. Es probable que al obtener el resultado final se encuentren otras

sustancias presentes en la muestra, sin embargo, solamente se reportará su presencia, concluyendo primordialmente sobre la identificación o ausencia de la sustancia que se buscaba como principal objetivo o de interés forense para darle mayor soporte a la teoría del caso como dato de prueba.

En los casos en los que se define el xenobiótico o sus metabolitos como objetivo de análisis, la elección de la técnica de confirmación dependerá del tiempo transcurrido desde su presunta exposición y de sus propiedades fisicoquímicas ya que estas dos características serán las que afectarán en mayor medida su distribución en el organismo y en las posibles matrices de las que se pueda disponer [30].

Estos análisis de confirmación, similar a las demás etapas, se verán influenciadas por la experticia de los analistas y su grupo de trabajo ya que de ellos dependerá el planteamiento del proceso analítico desde su inicio hasta su culminación con la entrega del dictamen por la cual, cada etapa tendrá que plantearse y analizarse antes de ser ejecutarse para asegurar de esta manera un cumplimiento eficiente del objetivo buscado.

Dentro de los métodos de confirmación descritos en este capítulo se presentan los siguientes:

- Separación o Cromatográficos:
 - ❖ Cromatografía de Gases.
 - ❖ Cromatografía de Líquidos.
- Espectroscópicos.
 - ❖ Espectrometría de Masas.
 - ❖ Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).
 - ❖ Espectrometría Atómica de Absorción.

Como se verá a continuación, por los fundamentos de cada técnica, los métodos de separación se emplean comúnmente para compuestos orgánicos de

cualquier índole, ya sean sustancias de abuso, plaguicidas o VOC's, mientras que los métodos espectroscópicos se emplean con mayor frecuencia para análisis de sustancias inorgánicas como los metales y las sales inorgánicas que de ellos se generen. La espectrometría de masas por su parte, es la excepción gracias a que esta técnica puede emplearse con los mismos fines que los métodos cromatográficos y es frecuentemente acoplada con estos métodos obteniendo mejores resultados de su acoplamiento.

1. Métodos de Separación o Cromatográficos.

Retomando el concepto de que la cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes son distribuidos entre dos fases, la fase estacionaria y la fase móvil, es necesario resaltar que los componentes se separan por sus diferentes tasas de migración, según la IUPAC. Así pues, la cromatografía puede clasificarse por su utilidad y en base al material que se utilice como eluyente para separar los solutos. De acuerdo a su utilidad la cromatografía se clasifica en: Analítica, utilizada para determinar los químicos presentes en una mezcla y en qué concentración se encuentran; y Preparativa, utilizada para purificar grandes cantidades de químicos. En nuestro caso, las cromatografías que se desarrollarán son puramente Analíticas, dejando de lado el tipo preparativo, salvo que sea empleado como un método de extracción del xenobiótico o su metabolito de la matriz de interés.

Dentro de los análisis de confirmación, las formas más comunes de esta técnica son la Cromatografía de Gases y la Cromatografía de Líquidos [78].

1.1. Cromatografía de Gases (GC).

La cromatografía de gases es la técnica empleada para la separación de sustancias volátiles y semivolátiles que son térmicamente estables gracias a la diferencia de volatilidad de cada componente de la muestra que le proporciona a cada uno un coeficiente de partición entre la fase móvil gaseosa y la fase

estacionaria en la columna [79]. Cada componente de una muestra, al eluir junto con la fase móvil gaseosa a través de la fase estacionaria (columna de separación), suministra tres unidades de información: posición, altura y ancho de los picos que posteriormente serán integrados y representados de forma gráfica en un cromatograma como el esquematizado en la Figura 11. La posición, un solo parámetro expresado cuantitativamente expresado como tiempo de retención, suministra la información cualitativa y los otros proporcionan la información cuantitativa [78].

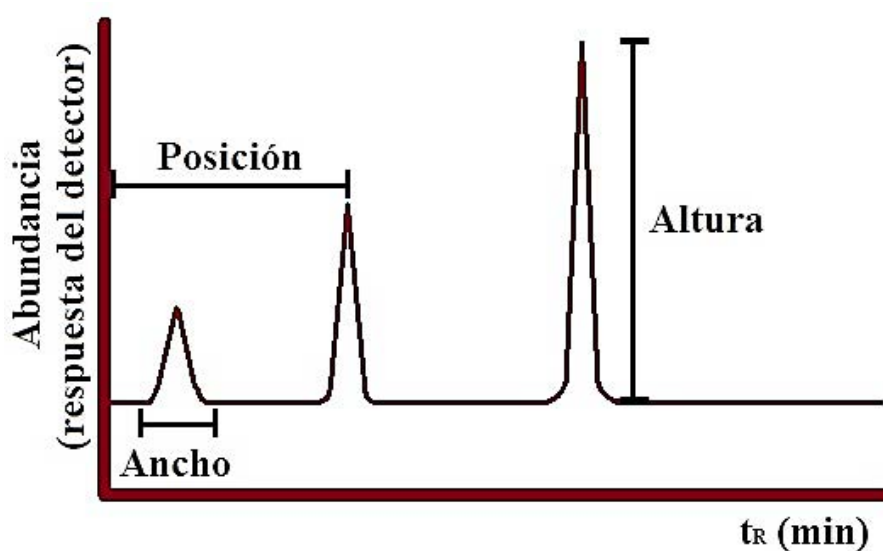


Figura 11. Esquema de un cromatograma.

Su principal desarrollo se ha reflejado en la determinación, identificación y cuantificación de compuestos volátiles (gases o líquidos), con puntos de ebullición de hasta 350 y 400 °C. Tiene las ventajas de ser sensible, rápido y relativamente sencillo, y si se maneja con suficiente cuidado, suministra información cuantitativa exacta con cantidades muy pequeñas de muestra.

En la cromatografía de gases la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte que a diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de

transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases: la Cromatografía Gas-Sólido (CGS) y la Cromatografía de Gas-Líquido (G-LC). La cromatografía de gas líquido tiene gran aplicación en todos los campos de la ciencia, incluida el área forense, y su denominación se abrevia normalmente como cromatografía de gases (**GC**).

En la cromatografía de gas sólido se produce la retención de los analitos de una fase estacionaria como consecuencia de la absorción física. La cromatografía gas sólido ha tenido una aplicación limitada debido a la retención semipermanente de las moléculas activas o polares y a la obtención de picos de elusión con colas muy significativas (como consecuencia del carácter no lineal del proceso de absorción), de modo que esta técnica no ha encontrado una gran aplicación excepto para la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular. La cromatografía gas líquido se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquido inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte.

Equipamiento.

Los componentes básicos de un instrumento para la cromatografía de gases se muestran en la Figura 12.

El **Gas Portador** debe ser químicamente inerte, por ejemplo, el helio, nitrógeno y el hidrogeno. El sistema de gas portador contiene a menudo un tamiz molecular para eliminar el agua u otras impurezas.

Existen principalmente dos **Tipos de Columnas**, de relleno y capilares o semicapilares. Las columnas contienen la fase estacionaria y en ellas tiene lugar la separación cromatográfica.

Los **Sistemas de Detección** ideales para la cromatografía de gases debe cumplir los siguientes requisitos [66]:

- ✓ Adecuada sensibilidad.
- ✓ Buena estabilidad y reproducibilidad.

- ✓ Respuesta lineal para los solutos que se extienda a varios órdenes de magnitud.
- ✓ Intervalo de temperaturas de trabajo comprendido desde la temperatura ambiente hasta al menos 400°C.
- ✓ Tiempos de respuesta cortos que sean independientes del flujo.
- ✓ Alta fiabilidad y manejo sencillo.
- ✓ Respuesta semejante para todos los solutos o por el contrario una respuesta selectiva y altamente predecible para uno o más tipos de solutos.
- ✓ No destructivo para la muestra.

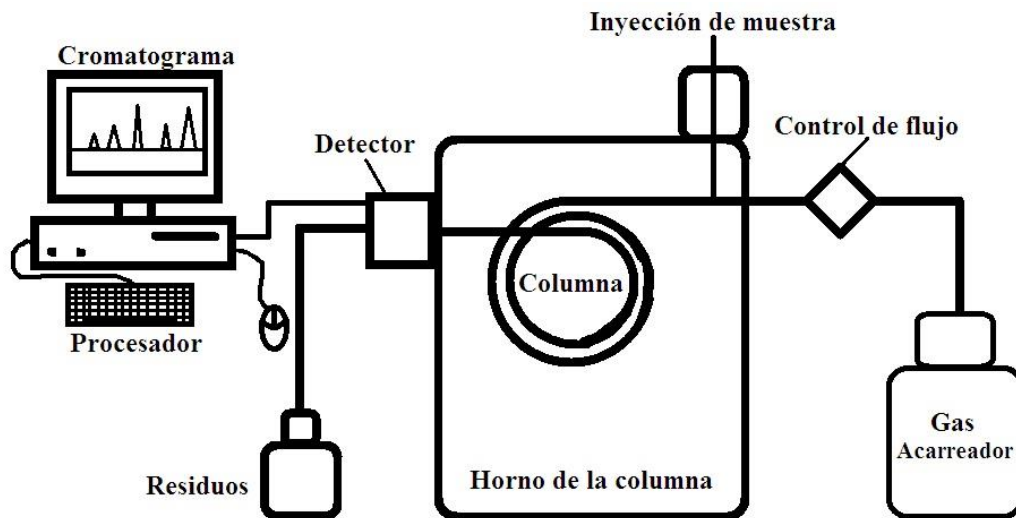


Figura 12. Estructura simplificada de un cromatógrafo de gases.

Existen diferentes tipos de detectores diseñados para mejorar la detección de alguna propiedad de las sustancias según su enfoque. Los detectores pueden ser [42]:

- **Detectores de conductividad térmica (TCD):** este detector, esquematizado en la Figura 13, cuenta con un par de filamentos sensibles a los cambios de temperatura que comparan la conductividad térmica de dos flujos de gases, el gas portador puro y el de la muestra. Los cambios en la temperatura de los filamentos calentados eléctricamente, son afectados por

la conductividad térmica del gas que fluye a su alrededor (muestra) y cada cambio es reconocido como una especie diferente. Finalmente, los cambios en esta conductividad térmica se detectan como un cambio en la resistencia eléctrica y pueden ser susceptibles a mediciones o cuantificaciones. Estos detectores son económicos y responden a la mayoría de los compuestos químicos. El inconveniente de estos detectores es que son relativamente de baja sensibilidad.

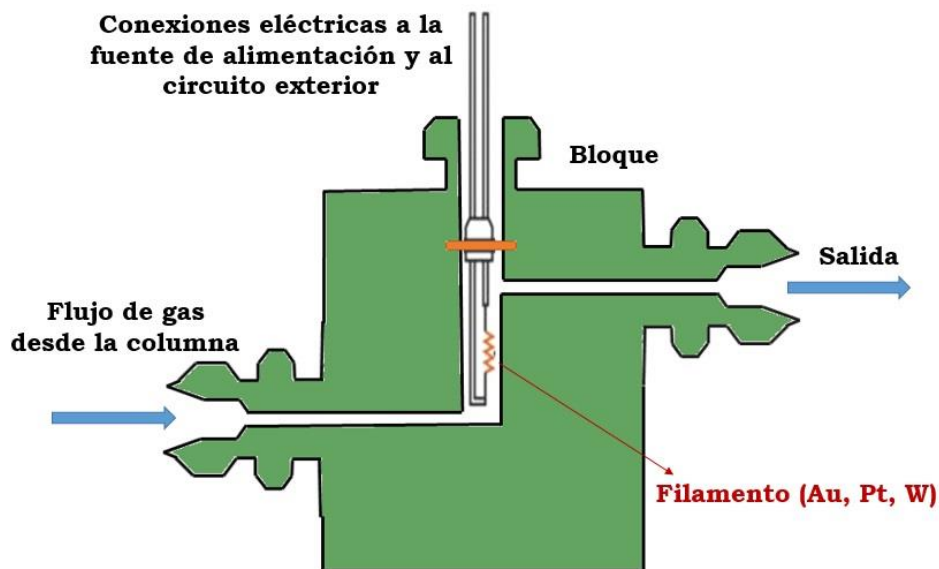


Figura 13. Esquema de un detector tipo TCD.

- **Detector de Ionización de Llama (FID):** en este detector, la muestra a analizar es encendida en una atmósfera de hidrógeno/aire lo que ocasiona la generación de iones y electrones que pueden conducir la electricidad a través de la llama como se ejemplifica en la Figura 14. Las partículas cargadas resultantes del proceso anterior que son recibidas por el detector se identifican gracias a que entre el extremo del quemador y un electrodo colector situado por encima de la llama, se aplica una diferencia de potencial de unos pocos cientos de voltios, y para la medición de la corriente que resulta (de unos $10^{-12}A$) se utiliza un amplificador operacional. El detector de ionización de llama posee una elevada sensibilidad (del orden de 10^{-13} g/s),

un gran intervalo lineal de respuesta (de 10^7), y poco ruido. Por lo general, es resistente y fácil de utilizar. Una desventaja del detector de ionización de llama es que se trata de un detector destructivo de la muestra.

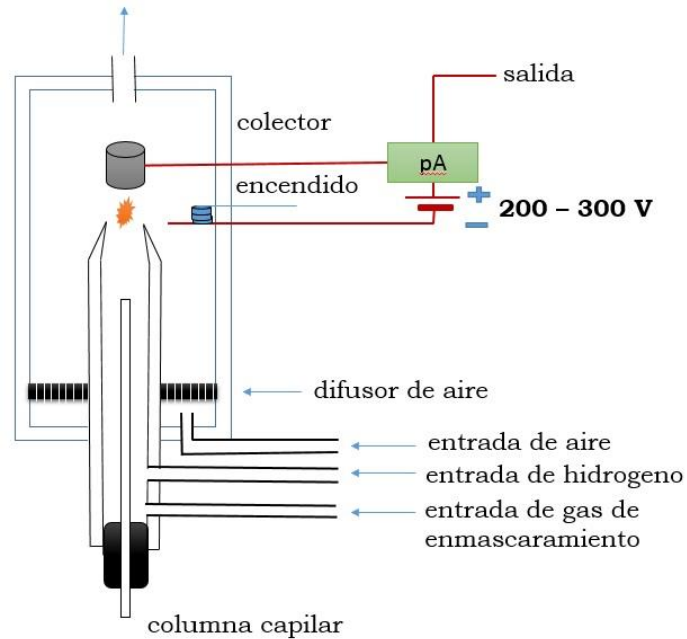


Figura 14. Esquema de un detector tipo FID.

- **Detectores NP (NPD):** como se observa en la Figura 15, la similitud con los componentes de los detectores FID es gracias a que son una variante de los detectores de ionización de llama con la particularidad de que un lecho alcalino ioniza selectivamente compuestos de nitrógeno y fósforo. Tienen un límite de detección inferior a los FID convencionales pero sin llegar a los límites de los detectores ECD y proveen mayor selectividad y ventajas para la confinación de compuestos nitrogenados o fosforados.

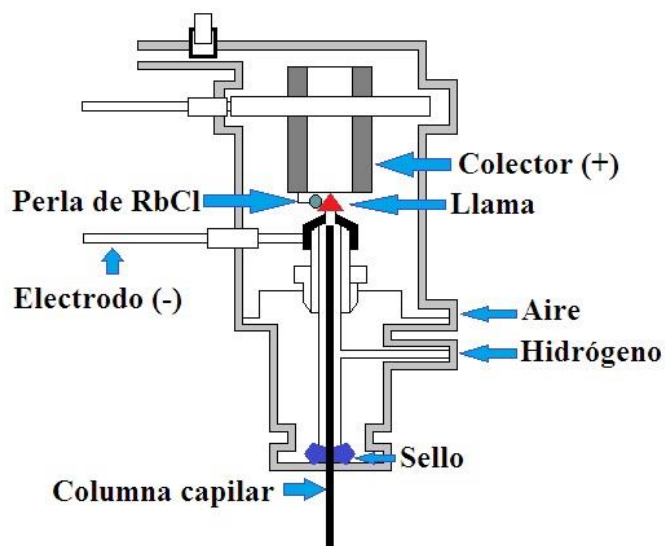


Figura 15. Esquema de un detector tipo NPD.

- **Detector de Captura de Electrones (ECD):** opera casi de la misma forma que un contador proporcional para la medida de radiación X. En este caso el efluente de la columna pasa sobre un emisor β , como níquel-63 o tritio (adsorbido sobre una lámina de platino o de titanio), como se puede apreciar en la Figura 16. Un electrón del emisor provoca la ionización del gas portador (con frecuencia se trata de nitrógeno) y la producción de una ráfaga de electrones. Los compuestos halogenados son especialmente reactivos a este tipo de detectores en forma similar a los peróxidos, quinonas, y grupos nitro; en cambio, no es sensible a grupos funcionales como aminas, alcoholes e hidrocarburos. Una aplicación importante del detector de captura de electrones es la detección y determinación de insecticidas clorados. Los límites de detección son aún más bajos que los detectores tipo FID y proveen de una gran selectividad de análisis.

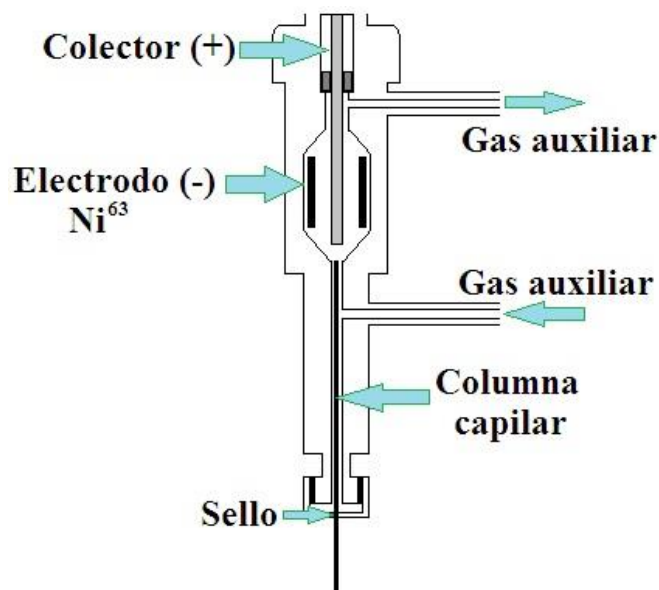


Figura 16. Esquema de un detector tipo ECD.

- Otros:** existen otros tipos de detectores como el detector fotométrico de llama y el detector de fotoionización que son empleados en otros campos como el análisis de la calidad del aire y de contaminación de mantos acuíferos, sin embargo, su fundamento no difiere demasiado de los detectores FID razón por la cual no se describirán detalladamente. Adicional a los detectores existentes, pueden emplearse otras técnicas para identificar los compuestos de una muestra problema, por ejemplo, los espectrómetros de masas, al ser acoplados a los métodos de separación pueden fungir como sistemas de identificación para analizar cada una de las sustancias que son recuperadas por los métodos cromatográficos. La Espectrometría de Masas se explica más adelante de forma individual.

Para la toxicología, tanto clínica como forense, la CG es el método de elección para el análisis de sustancias volátiles estables térmicamente como las sustancias de abuso, plaguicidas, VOC's y una gran variedad de toxinas. En la práctica, la principal limitación de la técnica es la estabilidad térmica de los compuestos de la mezcla o incluso de la propia matriz de análisis, principalmente en el área forense, situando la temperatura límite, como se mencionó antes, en 400

°C, temperatura a la cual los solutos que pueden volatilizarse eficazmente no superan los 1000 Dalton de peso molecular. Debido a las propiedades fisicoquímicas de las sustancias presentes en una mezcla, una gran variedad de análisis deben realizarse después de un proceso de derivatización, el cual es empleado para aportar estabilidad térmica a las sustancias volatilizadas presentes en la muestra.

Derivatización.

El proceso de derivatización es tal vez el punto crítico de la técnica ya que las sustancias que tienen un alto punto de ebullición o que son sustancias muy polares tienden a descomponerse o a formar especies cargadas durante el proceso de calentamiento dificultando e incluso volviendo imposible su análisis a través de esta técnica. La derivatización es entonces un método de modificar la sustancia de interés y de esta manera provocar que la nueva sustancia tenga un punto de ebullición mucho menor al de la sustancia sin derivatizar. Al disminuir los puntos de ebullición o modificar la polaridad de las sustancias se pueden mejorar parámetros importantes de los picos cromatográficos como su definición y resolución (incluyendo la selectividad y eficiencia), evitando de esta manera que un traslapamiento de picos oculte la presencia de sustancias en la mezcla o dificulte su cuantificación. Un ejemplo claro del efecto de la derivatización son los compuestos derivados de las halogenaciones los cuales aumentarán la resolución en detectores tipo ECD. De forma similar, pueden realizarse derivatizaciones que aumenten la masa molecular de las sustancias y de esta forma, al realizar una cromatografía acoplada a espectrometría de masas, se generen fragmentos que puedan reconocerse mejor [42].

Entre los procesos de derivatización más empleados se encuentra la “Sililación” y la “Acilación”.

De las derivatizaciones por sililación, las reacciones para formar compuestos derivados de trimetilsilil (TMS), son probablemente los más empleados en cromatografías de gases. El proceso de sililación tiene reacciones rápidas y

cuantitativas con sustancias como alcoholes, aminas, amidas y ácidos carboxílicos. Los productos de reacción suelen ser no polares y volátiles con puntos de ebullición bajos que presentan buenos resultados en CG. Un ejemplo es la reacción de sililación entre el Δ -9-THC-COOH (metabolito resultante del consumo de marihuana) y N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) que permite obtener resultados certeros ante CG. Otro agente que permite realizar este tipo de derivatizaciones es el N-metil-N-trimetilsililfluoroacetamida (MSTFA) con el cual se obtienen productos con puntos de ebullición aún menores que los obtenidos con BSTFA. El problema de estas reacciones es que en presencia de agua se obtienen reacciones peligrosas y productos inactivados que son una causa común de análisis toxicológicos fallidos.

La derivatización por acilación es la conversión de hidrógenos activos de grupos funcionales como hidroxilos, sulfidrilos y aminas, en ésteres, tioésteres y amidas. Las reacciones se llevan a cabo con ácidos carboxílicos o derivados de los mismos. Una de las reacciones de acilación más común es la inserción de grupos perfluoro acilo como el trifluoro acilo o pentafluoro acilo en grupos amino. Los productos de reacción cuentan con menor polaridad en el grupo amino, aumentan la masa de los fragmentos formados en la espectrometría de masas e incrementan la reactividad con detectores de tipo ECD. La desventaja de este tipo de derivatizaciones es que forman subproductos acidificados los cuales, si no son removidos antes de inyectar la muestra a analizar, pueden disminuir el tiempo de vida de las columnas empleadas. El ejemplo más claro es la acilación de anfetaminas para mejorar las propiedades cromatográficas de los extractos a analizar [42].

La elección de esta técnica se debe a que su empleo abarca una amplia cantidad de sustancias para las cuales, los resultados cuentan con una gran sensibilidad y selectividad gracias a los diferentes tipos de columnas y eluyentes disponibles en la actualidad. Aunado a este hecho, los equipos hoy en día cuentan con gran disponibilidad de configuraciones que les permiten modificar los tiempos de análisis gracias a las rampas de calentamiento de las cuales se dispone y los inyectores automatizados. Finalmente, al acoplar un espectrómetro de masas como

detector, la sensibilidad de la técnica aumenta hasta el orden de nanogramos inyectando volúmenes del orden de microlitros. Así mismo, la asociación entre estas técnicas aporta una especificidad única a la hora de identificar un compuesto determinado [79].

Identificación.

En un sistema cromatográfico estable, el tiempo de retención de un soluto particular es constante, y por lo tanto puede utilizarse para identificar ese soluto. Así, aunque la cromatografía es primordialmente una técnica de separación, es posible identificar los compuestos separados de una mezcla compleja por medio de sus tiempos de retención, los cuales no pueden variar en más de **0.2 unidades de tiempo**.

Los tiempos de retención pueden predecirse a partir de los tiempos conocidos de otros miembros de la serie homóloga. La probabilidad de una coincidencia exitosa en los valores de los tiempos de retención depende de la disponibilidad de compuestos de referencia, es decir, de sustancias patrones.

El método de las adiciones estándar se puede utilizar para verificar el tiempo de retención del compuesto en cuestión. El tiempo de retención del pico en la muestra no debe cambiar después de efectuada la adición con respecto al valor original si ambos compuestos (el problema y el estándar añadido) son el mismo.

Cuando no se tienen disponibles los compuestos de referencia debe recurrirse a la información estructural independiente que proporcionan otras técnicas espectroscópicas. En muchos casos la identificación de compuesto puede hacerse aislando el pico durante la obtención del cromatograma y analizándolo a continuación por un método suplementario. La espectrometría de masas se ha acoplado con éxito a la cromatografía tanto de gases como líquida. La información que se puede obtener incluye el peso molecular y la fórmula empírica, información estructural y confirmación de la estructura.

Otro método de identificación es el método de coincidencia el cual es el método más simple de identificación cromatográfica y consiste en comparar el

volumen de retención de un compuesto problema con el de un patrón, ambos determinados en las mismas condiciones operativas y en la misma columna. Como estas condiciones son difíciles de mantener constantes en cromatogramas registrados sucesivamente y todavía más difíciles en días diferentes, es mejor añadir el patrón como un marcador a la muestra problema y comprobar si no coincide con alguno de los picos originales. Si por el contrario, aumenta la altura de alguno de ellos, es una evidencia de la coincidencia de los volúmenes de retención. Es importante notar que una respuesta negativa no es ambigua; se puede afirmar a partir de ella que ninguno de los componentes de la muestra es el patrón [78].

Cuantificación.

Los análisis de cuantificación en CG pueden obtenerse por varios métodos. El empleo del método por estándar interno y externo será descrito respectivamente. Para ambos casos es más común emplear el área bajo la curva en lugar de la altura del pico debido a que algunas variables como el flujo y la medición de la línea base provocan mayores imprecisiones en la altura del pico que en el área bajo la curva.

El método de cuantificación por **estándar externo** es similar en CG a la mayoría de los métodos analíticos. En primera instancia se obtiene el cromatograma de una sustancia estándar de **concentración conocida** de forma individual a la muestra problema y se registra el o las área(s) bajo la curva(s) del pico o los picos por medio de un sistema de integración electrónica. Después de este proceso se obtiene el cromatograma de la muestra así como el área bajo la curva del pico o los picos y se realiza una comparación directa entre ellos. La ecuación que se emplea para conocer la concentración de la muestra es la siguiente:

$$\textit{Concentración problema} = \textit{Concentración del estándar} \times \frac{\textit{área problema}}{\textit{área del estándar}}$$

El empleo del estándar externo tiene como límite el rango de linealidad del método, esto significa que es necesario verificar de forma independiente que el estándar empleado cumple con la proporcionalidad entre el aumento de la concentración y el área bajo la curva. Lo más importante para que este modo de cuantificación resulte adecuado es que todas las variables de análisis entre el estándar externo y la muestra problema sean las mismas, es decir, que los volúmenes inyectados sean iguales, que el rango de recuperación sea el mismo, etc. Por estas razones la cuantificación por estándar externo no suele ser empleado en casos en los que no se tenga información alguna de la sustancia problema a menos que el analista esté completamente seguro de poder controlar todas las variables de análisis. Por ejemplo, cuando se realiza un proceso de extracción de tipo líquido-líquido, es difícil cerciorarse que la relación entre el volumen del disolvente y la cantidad de analito presente en la muestra sea la misma a la del estándar conocido. Sin embargo, la técnica se emplea gracias a que el empleo de curvas de calibración que corresponden a comportamientos lineales, disminuyen este error introducido al realizar el análisis, por otro lado, al inyectar volúmenes pequeños con concentraciones muy diluidas la relación entre disolvente y analito presenta menos variaciones significativas en los resultados obtenidos. Es importante cerciorarse que el proceso de extracción y secado del extracto se realicen de forma correcta.

En el método de cuantificación por **estándar interno o patrón interno**, a todas las muestras, tanto las disoluciones estándar empleadas en la curva de calibración como la muestra problema, se les agrega una cantidad específica y constante de concentración conocida del patrón interno el cual debe ser diferente al analito a cuantificar, de este modo, la concentración de la muestra problema dependerá de la señal relativa que ésta presente con respecto a la registrada por el patrón interno. Es importante notar que las disoluciones estándar empleadas en la curva de calibración sí deben ser de la misma especie al analito a cuantificar en la muestra problema. La cuantificación por este método puede realizarse de dos formas. En el primer método de cuantificación no se requiere de una curva de

calibración, solamente se requiere una disolución estándar de calibrado de la misma especie que el analito. Lo más importante en este caso es conocer la respuesta que tiene el equipo con respecto al estándar interno lo cual se logra calculando la “respuesta relativa” o “factor de respuesta” que normalmente se denomina como “r”. Para calcular “r” se emplea la siguiente fórmula:

$$r = \frac{\frac{C_a}{A_a}}{\frac{C_s}{A_s}} \quad \text{ecuación 1}$$

Es decir:

$$r = \frac{(C_a)(A_s)}{(C_s)(A_a)} \quad \text{ecuación 2}$$

Donde C_a es la concentración de la disolución estándar de calibrado; A_a es el área bajo la curva de la disolución estándar de calibrado; C_s es la concentración del patrón interno y A_s es el área bajo la curva del patrón interno.

Una vez conocido el factor de respuesta y obtenido el área bajo la curva de la muestra problema, entonces se puede calcular la concentración del analito de interés ya que al agregar a la muestra problema la misma cantidad de estándar interno con la misma concentración, obtendremos una relación similar a la ecuación 2:

$$r = \frac{(C_p)(A_s)}{(C_s)(A_p)}$$

Donde C_p es la concentración de la muestra problema y A_p será el área bajo la curva de la muestra problema. Dado que el único dato que se desconoce es la concentración problema, podemos despejar C_p de la ecuación, obteniendo:

$$C_p = (r)(A_p) \left(\frac{C_s}{A_s} \right)$$

Este método de cuantificación tiene el inconveniente de presentar índices de error altos (comparados con los valores obtenidos al emplear una curva de calibración), del orden de 10 a 15%, similar al método de cuantificación por estándar externo que oscila entre el 10 y el 20%.

La segunda forma de cuantificar al analito de interés es a través de la interpolación de su área bajo la curva, en la curva de calibración obtenida graficando la relación de áreas contra la relación de concentraciones.

$$\text{Relación de áreas} = \frac{\text{Área de la disolución estándar}}{\text{Área del patrón interno}} = \frac{A_a}{A_s}$$

$$\text{Relación de concentraciones} = \frac{\text{Concentración de la disolución estándar}}{\text{Concentración del patrón interno}} = \frac{C_a}{C_s}$$

Donde C_a es la concentración de la disolución estándar para la curva de calibración; A_a es el área bajo la curva de la disolución estándar para la curva de calibración; C_s es la concentración del estándar interno y A_s es el área bajo la curva del estándar interno.

Al realizar una regresión lineal de la gráfica obtenida podemos entonces obtener la relación de concentraciones entre la muestra problema y el patrón interno a través de la relación de áreas entre ambos.

Dado que este procedimiento resulta más complicado, a continuación mostramos un ejemplo de cálculo para orientar al estudiante a realizar dichos cálculos.

Tabla 8. Datos obtenidos para la curva de calibración para el analito A.

Concentración de la disolución estándar (ng/mL)	Concentración del patrón interno (ng/mL)	Área de la disolución estándar	Área del patrón interno	Relación de concentraciones	Relación de áreas
10	50	15000	72000	0.20	0.205
25	50	38000	71000	0.50	0.535
50	50	74000	74500	1.0	0.993
100	50	130000	65500	2.0	1.985
200	50	305000	75500	4.0	4.040
Problema (P)	50	62000	83000	Desconocida (D)	0.747

Al graficar y realizar la regresión lineal obtenemos:

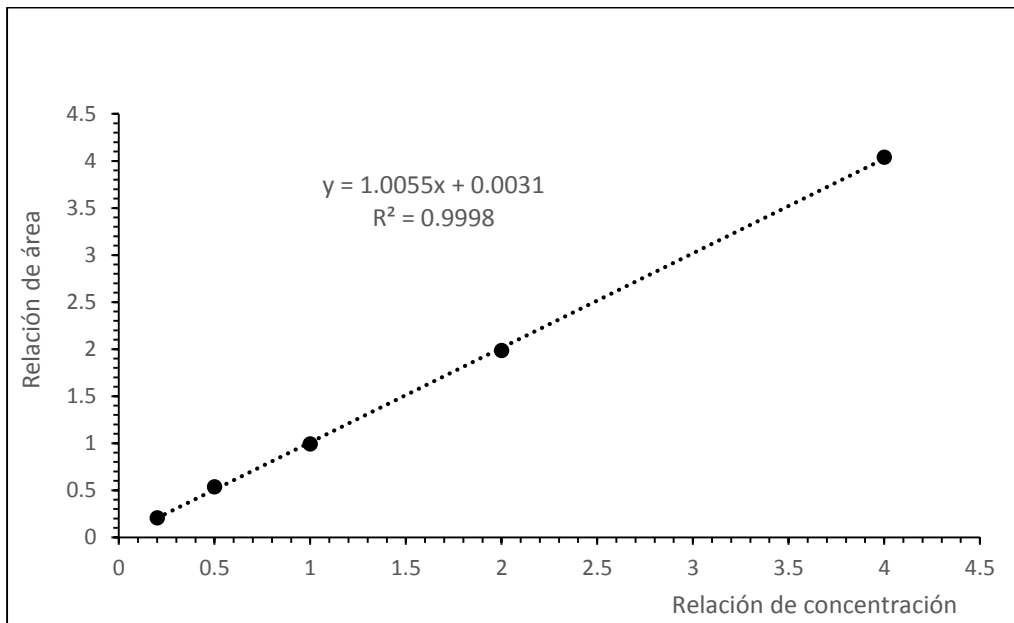


Figura 17. Curva de calibración por patrón interno.

La ecuación obtenida de la regresión lineal es:

$$Y = \text{relación de área} = 1.0055x + 0.0031$$

Si la relación de área de la muestra problema es $\frac{A_P}{A_S} = 0.747$

Tenemos que la ecuación queda expresada de la siguiente manera:

$$0.747 = 1.0055x + 0.0031$$

Donde “x” es la relación de concentración que al ser despejada y evaluada nos da un valor de 0.7399.

Si sabemos que la relación de concentraciones es:

$$\frac{C_P}{C_S} = 0.7399$$

Dado que conocemos C_S (50 ng/mL), se despeja C_P y se obtiene el valor de

$$C_P = 36.995 \text{ ng/mL}$$

Con fines comparativos, al usar el dato anterior del área bajo la curva de la muestra problema para realizar los cálculos de concentración a través del primer método, con cada una de las disoluciones estándar, manteniendo la misma concentración del patrón interno y suponiendo un manejo ideal para la cromatografía de gases con igualdad en volúmenes de inyección, flujo, etc., se obtendrían los siguientes valores de concentración para la muestra problema:

Recordar que el valor de la concentración se obtiene a través de la ecuación:

$$C_P = (r)(A_P) \left(\frac{C_S}{A_S} \right)$$

Tabla 9. Valores de concentración para el analito A empleando el primer método de cálculo.

Conc. de la disol. estándar (ng/mL)	Conc. del patrón interno (ng/mL)	Área de la disol. estándar	Área del patrón interno	Área de la muestra problema	r (para cada disol.)	Conc. de la muestra problema (ng/mL)	Error (%)
10	50	15000	72000	83000	0.960	41.333	11.727
25	50	38000	71000	83000	0.934	40.789	10.257
50	50	74000	74500	83000	1.006	41.891	13.237
100	50	130000	65500	83000	1.007	47.692	28.916
200	50	305000	75500	83000	0.990	40.655	09.895
Promedio	50	112400	71700	83000	0.979	42.473	14.806

Tras evaluar la concentración problema a través de los valores obtenidos para cada una de las disoluciones estándar, se puede observar que el valor de concentración promedio es de 42.473 ng/mL, que al compararlo con el obtenido de la curva de calibración de 36.995 ng/mL, presenta un error promedio de 14.806 % con un rango entre 9.895 a 28.916 %.

De tal manera se observa que, el cálculo de concentraciones de muestras problema siempre será más confiable si se realiza por medio de una curva de

calibración con disoluciones estándar de la misma especie que el analito, a las cuales se les agrega una cantidad conocida, constante y de concentración conocida de un patrón interno. Sin embargo, si se cuenta con poca disponibilidad de sustancias estándar o de patrón interno, es factible realizar la cuantificación del analito empleando el factor de respuesta como método alternativo si se considera el índice de error que este método conlleva.

1.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC O CLAR).

La cromatografía líquida (LC), al igual que las demás técnicas cromatográficas, es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, a diferencia de la CG que emplea como fase móvil un gas inerte, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria. La LC se lleva a cabo en una columna de vidrio en la cual se coloca la muestra por la parte superior y se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Para aumentar la eficiencia en la separación, en la cromatografía de alta resolución; el tamaño de las partículas de fase estacionaria se disminuye hasta el orden de los micrones, usando altas presiones para lograr que la fase móvil pueda fluir (La CCF y en papel pertenecen al tipo de cromatografía líquida pero no serán abordadas ya que no son de alta resolución y no son empleadas como métodos de confirmación) [66].

La HPLC, es una técnica de análisis químico ampliamente utilizada, la cual permite identificar cualitativamente y cuantitativamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla. Dado que existen muchas variantes de HPLC, a manera de resumen se presenta la siguiente tabla (Tabla 10), que nos muestra los tipos de cromatografía líquida de alta resolución que existen así como algunas de sus características principales.

Tabla 10. Tipos de Cromatografía Líquida.

Tipo de LC	Tipo de fase móvil	Tipo de fase Estacionaria	Características
Partición	Líquido	Líquido (En soporte sólido)	<p>*Útil para la separación de compuestos estrechamente relacionados, es decir, para series de compuestos.</p> <p>*Su selectividad se da gracias a la diferencia de solubilidad del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria. El analito y la fase estacionaria deben pertenecer al mismo comportamiento polar.</p> <p>*Dependiendo de la fase estacionaria, será la selectividad de la técnica.</p> <p>*Fase normal: F. Estacionaria y el analito son polares.</p> <p>*Fase reversa/inversa: F. Estacionaria y el analito son no polares. (Puede emplearse para detección de iones como nitratos y cloratos)</p> <p>Ejemplos: aminoácidos, alcoholes alifáticos, fenoles, plaguicidas, otros.</p>
Adsorción	Líquido (No polar)	Sólido (Polar) *Sílice *Alúmina	<p>*Útil para compuestos orgánicos neutros.</p> <p>*Compuestos no polares con masas moleculares inferiores a 5000 Dalton y sustancias no ionizantes.</p> <p>*Su selectividad es en base a la afinidad de la sustancia por la fase estacionaria.</p> <p>*Capas de diferenciar entre isómeros.</p> <p>*Tendencia de la Adsorción: Ácido C.>Alcohol>Carbonilo>Éster>Hidrocarburo</p> <p>Ejemplos: Vitaminas, Sustancias de abuso, antidepresivos tricíclicos, carotenoides, porfirinas, otros.</p>
Gel	Líquido	Líquido	<p>*La separación de los analitos se da gracias a su capacidad para penetrar en los poros de la fase estacionaria la cual presenta una estructura uniforme.</p> <p>*Las moléculas más pequeñas al tamaño de los poros no serán retenidas por la fase estacionaria, al igual que las moléculas de tamaño superior a los poros. Las demás moléculas serán retenidas en función de la relación que exista entre su tamaño y el de los poros.</p>

			<p>*La estructura de los analitos debe ser mecánica y químicamente estables y tener bajo carácter iónico</p> <p>Ejemplos: polímeros, proteínas de alimentos, glucosa y fructuosa de frutas, ácidos grasos</p>
Intercambio iónico	Líquido	Sólido	<p>*La fase estacionaria es un sólido compuesto de macromoléculas en redes tridimensionales capaces de intercambiar iones de carga equivalente a las encontradas en disolución.</p> <p>*Los iones de mayor carga y menor radio hidratado contarán con una retención mayor.</p> <p>*La fase móvil suele ser una mezcla de disoluciones acuosas con metanol u otro disolvente miscible en agua por lo cual no es aplicable para la detección de etanol en matrices biológicas.</p> <p>*Es necesario regenerar la columna cada determinado número de análisis.</p> <p>Ejemplo: análisis de contaminación en agua.</p>

De las cromatografías antes enunciadas, las de mayor aplicación en el área forense serán la de partición y de adsorción ya que la cromatografía de intercambio iónico, a pesar de ser empleada en el análisis de agua y de poder identificar compuestos de especies metálicas, es suplida por análisis como la espectroscopía atómica de absorción con sus diversos accesorios como con flama, horno de grafito o generador de hidruros (FAAS, HG-AAS, GHAAS) o la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Por su parte, la cromatografía en gel tiene mayor aplicación en estudios toxicológicos clínicos en los que es necesario conocer la identidad de moléculas con estructuras complejas y voluminosas como las proteínas, o en aplicaciones industriales de síntesis en las que se emplea mayoritariamente para la identificación de polímeros o biopolímeros sintéticos.

Esta técnica ha tenido un gran auge dado que a diferencia de la cromatografía de gases, no se necesita volatilizar las muestras de análisis y por consiguiente, la separación de las sustancias no depende de su estabilidad

térmica, evitando de esta manera el proceso de derivatización que debe emplearse para el análisis de muchas sustancias con puntos de ebullición altos o polaridades elevadas. Por otro lado, debido a la complejidad de los análisis toxicológicos con aplicación forense relacionados al consumo de sustancias de abuso, entre ellos el alcohol o la ingesta accidental de metanol, algunas variantes de HPLC son prácticamente imposibles de emplear a menos que la presencia de estos solventes esté descartada con certeza o su detección no influya de forma adversa al proceso judicial relacionado. De igual forma, en el caso de la cromatografía líquida de adsorción en la cual se emplean solventes orgánicos como el hexano, entre otros, la técnica queda descartada cuando se intenta identificar el consumo o exposición a sustancias de tipo VOC's ya que el mismo eluyente introduciría interferencias y falsos positivos o negativos en los análisis toxicológicos, de modo tal que en estos casos se prefiere el empleo de la CG con acoplamiento a técnicas espectrales como la espectrometría de masas [66].

Equipamiento.

Un equipo convencional de HPLC, sin acoplamiento con otras técnicas puede ser esquematizado en la Figura 18.

La fase móvil son disolventes que deben contar con un grado de pureza mínima de 99%, preferentemente con grados superiores, de esta manera se evita la introducción de interferencias a través de él, de igual forma se tienen que filtrar los disolventes antes de ser inyectados en la columna para evitar la presencia de pequeñas partículas que puedan interferir en el análisis o que puedan tapar la columna. Los disolventes pueden inyectarse de forma individual y en los casos que se necesitan mezclas pueden realizarse por el analista o bien, existen algunos equipos con cámara de mezclado en los cuales se puede programar el análisis para que el equipo tome las cantidades indicadas de cada disolvente y realizar la mezcla antes de ser inyectada. Cuando se emplea el mismo disolvente durante toda la separación, el proceso lleva por nombre isocrático. Cuando la composición

de la fase móvil cambia a lo largo de la separación, el proceso es llamado en gradiente.

La bomba de presión envía el disolvente hacia la válvula inyectora que es una válvula de seis vías que permite introducir al disolvente y la muestra. Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan al detector, el cual da una señal eléctrica proporcional a la cantidad del analito presente; esta señal es enviada al registrador que a su vez da un cromatograma de intensidad en función del tiempo; lo ideal en el cromatograma es obtener picos gaussianos los cuales corresponden cada uno a un componente diferente de la muestra.

Existen dos principales tipos de detectores, los que miden alguna propiedad del disolvente o los que miden alguna propiedad del analito. Los más empleados son los detectores que se fundamentan en alguna técnica independiente para medir la propiedad en cuestión. Existen los detectores de absorbancia, fluorescencia, índice de refracción, dispersión de luz, electroquímicos y de espectrometría de masas. Este último es el más empleado en el área de la toxicología forense y clínica.

El integrador calcula el área de cada pico, la cual se puede relacionar con la concentración de la sustancia si se tiene una curva de calibración; de lo contrario, los picos se emplean solamente para la identificación cualitativa de los componentes [66].

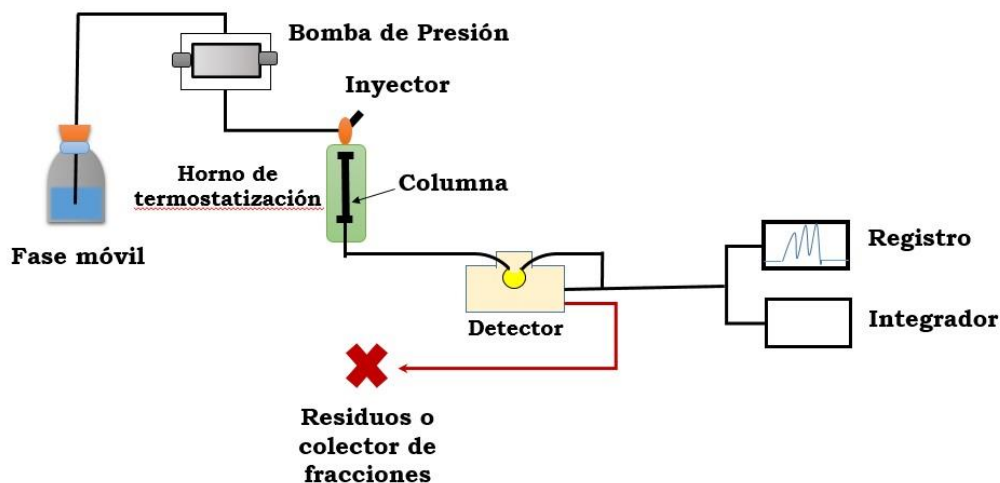


Figura 18. Esquema de los componentes de un sistema HPLC.

Identificación.

Al igual que en CG, la cromatografía líquida de alta resolución puede emplearse tanto para identificar los diferentes componentes de una muestra desconocida, como para cuantificar los analitos que ya han sido identificados.

El tiempo de retención de las sustancias en la columna o fase estacionaria, dado que es un parámetro cromatográfico, independiente al tipo de cromatografía que se realice, permite la identificación de los analitos por su comparación directa con bases de datos (siempre y cuando las condiciones de análisis sean compatibles), o por el empleo de patrones estándares de referencia. Así pues, si una determinada sustancia presenta una diferencia en los tiempos de retención menor a 0.2 min entre el analito desconocido y un patrón de referencia, se puede declarar la identidad del compuesto después de corroborar su estructura por una técnica complementaria.

La adición de un estándar de referencia del cual se conozca su tiempo de retención, la intensidad de su señal y el área bajo la curva de una concentración conocida en el mismo equipo de HPLC, seguirá siendo el mejor método de identificación ya que la adición de este estándar dejará claro si la sustancia desconocida es la misma que la sustancia patrón al presentar ambos el mismo tiempo de retención y un aumento en la intensidad de la señal en dicho tiempo.

Como se ha venido mencionando a lo largo del manual, el empleo de técnicas acopladas aumenta la credibilidad de los resultados y permite la identificación por más de una vía ya que al contar con fundamentos diferentes entre las técnicas, la coincidencia en la elucidación de la sustancia refuerza los resultados entre ambas.

De esta forma, la técnica HPLC presenta mejores resultados al estar acoplada a la espectrometría de masas en tándem como detector ya que se podrá separar los componentes de la muestra, identificarlos a través del empleo de estándares de referencia y se conocerá la estructura molecular que se obtiene como resultado de realizar una MS, dando como resultado final que la recopilación

de esta información aumente la certeza de los resultados y disminuya las identificaciones erróneas por medio una sola técnica.

Cuantificación.

La cuantificación de los analitos aislados e identificados en HPLC no difiere en nada de los métodos de cuantificación planteados en el apartado de la cromatografía de gases. Dicho proceso puede realizarse tanto por estándares externos como estándares internos.

Como pudimos observar con el ejemplo plasmado en la CG, la cuantificación a través de un patrón interno de forma simultánea con el empleo de una curva de calibración presenta mejores resultados que las cuantificaciones sencillas en las que no se verifica la linealidad del comportamiento, así como la relación proporcional entre la concentración y el área bajo la curva obtenida de los cromatogramas.

La importancia de este proceso es que al verificar que el modelo matemático que se emplea para los cálculos de concentración presenta un comportamiento lineal y al mismo tiempo un buen coeficiente de correlación, se asegura que los valores obtenidos cuenten con una buena precisión ya que al realizar cuantificaciones sencillas no es posible verificar que el valor de referencia esté dentro de los valores de desviación aceptados, dando como resultado que el índice de error sea elevado y en consecuencia, poco confiables.

Al igual que en la CG, el patrón interno debe ser un compuesto de pureza igual o superior al 99%, sus picos deberán estar resueltos en el cromatograma, deberá ser diferente a las especies presentes en la muestra a analizar, que no reaccione con la fase móvil ni con los analitos de la muestra, eluir cerca de los picos de interés y presentar una naturaleza similar a los supuestos analitos presentes en la muestra.

2. Métodos espectroscópicos.

Los métodos espectroscópicos son un amplio grupo de técnicas analíticas que se basan en las interacciones de la energía (en la mayoría de ellas como radiación electromagnética), con la materia. El tipo de espectroscopía dependerá de la propiedad que sea medida la cual comúnmente será la intensidad de energía absorbida o emitida.

Según la naturaleza de la interacción pueden reconocerse las siguientes espectroscopías:

- **Electromagnética:** son interacciones de la materia con radiación electromagnética.
- **Electrónica:** son interacciones con haces de electrones. En este caso la variable a medir es la energía cinética de los electrones.
- **Acústica:** son interacciones entre la materia y el sonido midiendo en este caso la frecuencia del sonido.
- **Dieléctrica:** se mide la respuesta frente a un campo eléctrico externo el cual crea una frecuencia que puede ser cuantificable.
- **Mecánica:** en esta técnica se mide la frecuencia de un estrés mecánico externo, por ejemplo, una torsión aplicada a una fracción de la materia.
- **Masa:** es la interacción de especies cargadas con campos magnéticos y/o eléctricos, dando lugar a un espectro de masas. Este tipo de técnicas tiene a la masa "m" como variable a medir de forma indirecta ya que el registro se hace sobre la energía cinética de dicha masa o partícula. En la actualidad se ha clasificado a estas técnicas de forma independiente a los métodos espectroscópicos ya que a pesar de obtener un espectro como resultado final, no se registra el proceso de la absorción o emisión de energía por la materia, sino que se mide una relación masa/carga por lo cual se prefiere llamar a estos métodos como espectrométricos.

La mayoría de los métodos espectroscópicos se diferencian en “atómicos” o “moleculares” según si se aplican a átomos o moléculas. Junto con esta diferencia, se puede distinguir la siguiente clasificación que dependerá del fenómeno observado:

- ❖ **De absorción:** pueden medir la propiedad de interés en el rango de los espectros en los cuales una sustancia absorbe la energía proporcionada por una fuente.
- ❖ **De emisión:** estas técnicas miden la propiedad deseada en el rango de espectros en los cuales una sustancia irradia o emite cierta cantidad de energía después de haberla absorbido.
- ❖ **De dispersión:** mide la cantidad de energía que una sustancia dispersa a ciertas longitudes de onda, ángulos de incidencia y ángulos de polarización. El proceso de dispersión es mucho más rápido que el proceso de absorción/emisión.

De esta forma, los diferentes métodos espectroscópicos pueden clasificarse de la siguiente manera:

Absorción	Emisión	Dispersión
<ul style="list-style-type: none"> • IR • UV-Visible • Microondas • Atómica • Rayos X • RMN 	<ul style="list-style-type: none"> • Fluorescencia • Fosforescencia • Fluorescencia de Rayos X • ICP • Espectrometría de Emisión 	<ul style="list-style-type: none"> • Espectroscopía Raman • Turbidimetría • Nefelometría

Figura 19. Clasificación de los métodos espectroscópicos.

Es necesario hacer notar que la espectrometría de masas, tiene muy poco en común con las técnicas clásicas de espectroscopía, ya que, en sentido estricto, no es propiamente un método espectroscópico debido a que, desde el punto de vista clásico, un espectro es una información bidimensional que representa un

parámetro relacionado con la emisión o absorción de una radiación (electromagnética), con la energía de dicha radiación. En la espectrometría de masas no se emplea ningún tipo de radiación, por lo que básicamente, no puede ser considerada una técnica espectroscópica. Otra diferencia esencial que presenta la espectrometría es que en la espectroscopía los procesos que se generan son puramente físicos, es decir, no son destructivos, de forma que la muestra utilizada para la obtención del espectro no se modifica químicamente y se puede recuperar sin alteración alguna. Por el lado opuesto, en la espectrometría de masas, durante la obtención del espectro tienen lugar procesos químicos, lo que conlleva que la muestra empleada sea destruida y no pueda recuperarse por ningún proceso químico conocido.

Actualmente, el uso de métodos espectroscópicos está generalizado, debido a su rapidez, a la gran gama de instrumentación disponible y sus grandes posibilidades de automatización. En muchos casos es posible la resolución de un problema analítico sin necesidad de recurrir a métodos de otro tipo y la eficiencia de su empleo en diferentes áreas ha sido comprobada por los resultados obtenidos a lo largo de evolución y especialización.

En el capítulo anterior se hizo mención sobre la espectroscopía IR y UV-Visible como técnicas presuntivas en el campo de la toxicología forense. Para este capítulo y esta unidad solamente se abordará la espectrometría de masas, atómica de absorción e ICP (con acoplamientos a espectrometría de masas), ya que son las técnicas más empleadas en el campo de la toxicología forense para identificar y cuantificar distintos xenobióticos o sus metabolitos.

Es importante recordar que estas técnicas se plantean como una opción para el analista quien será el responsable en elegir las metodologías a emplear en su análisis para cada caso en particular teniendo como opción el incluir alguna otra técnica de su consideración, o la exclusión de alguna de ellas para cumplir con su objetivo primordial que será la determinación de las sustancias de interés jurídico.

2.1. Espectrometría de Masas (MS).

La Espectrometría de Masas es una técnica microanalítica empleada para identificar y cuantificar compuestos de naturaleza desconocida, así como también para elucidar la estructura de la sustancia analizada. La detección de compuestos puede llevarse a cabo con cantidades realmente pequeñas de muestra del orden de picomoles y se puede obtener información característica como el peso o la estructura del analito.

Está basada en la obtención de iones a partir de las moléculas orgánicas en fase gaseosa, que una vez obtenidos se separarán de acuerdo con su relación masa/carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado.

Existen diferentes fuentes de ionización, pero en todos los casos, alguna forma de energía se transfiere a las moléculas a analizar para inducir su ionización. Como resultado de la ionización, un espectro de masas será una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos. Dado que los procesos en esta técnica son de naturaleza química, la presencia y abundancia en el espectro de determinados tipos de iones, identificados a partir de su masa, será función de la estructura química de cada compuesto; la información ofrecida por un espectro de masas es, de alguna forma, comparable a la obtenida mediante una gran cantidad de reacciones utilizadas para la determinación de estructuras por vía química, ya que el rompimiento de varios enlaces químicos permite la producción de fragmentos de ion cuya masa es igual a la suma de las masas atómicas de un grupo de átomos que retienen la carga positiva durante el proceso de fragmentación.

En la técnica clásica de impacto electrónico (EI, electron ionization), algunas de las moléculas ionizadas del analito se dividen en una variedad de fragmentos ionizados, el patrón de fragmentación resultante así como los iones residuales constituyen el espectro de masas. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado como su "huella química" para caracterizar el analito[80].

Equipamiento.

De forma general, un espectrómetro de masas debe contar con un sistema de introducción de muestras, una fuente de ionización, un analizador de iones (para lograr su separación selectiva), un sistema detector con un registrador integrado, sistema de vacío, sistema de control y un sistema de datos. En la Figura 20 se puede observar un esquema simplificado de un espectrómetro de masas.

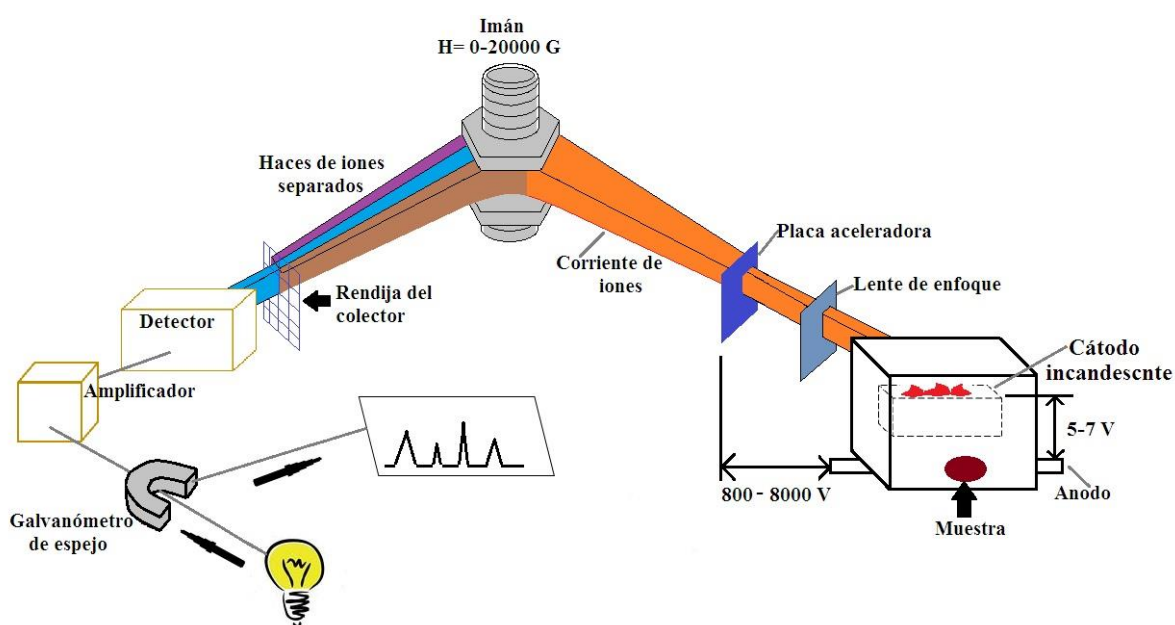


Figura 20. Esquema de un Espectrómetro de Masas.

El diseño del espectrómetro de masas debe ser capaz de cumplir cuatro funciones en las cuales está basada la técnica:

- Vaporizar sustancias de volatilidades muy variables.
- Ionizar moléculas neutras que se encuentren en fase gaseosa.
- Separar los iones generados en función de su relación masa/carga (m/z).
- Detectar los iones separados y registrar la información recopilada.

El proceso de análisis por espectrometría de masas comienza en llevar el compuesto a analizar a fase gaseosa, la muestra debe tener una presión de vapor de 10^{-2} mmHg, debido a que las moléculas deben migrar por difusión desde el sistema de entrada hacia la cámara de ionización. Las muestras pueden introducirse al espectrómetro de masas usando una sonda directa o por entrada en lote (batch) para sólidos puros o líquidos volátiles. Los analitos obtenidos por diferentes técnicas de separación (cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, electroforesis capilar, etc.) pueden entrar al espectrómetro de masas tan pronto como salgan de la columna de separación. Ya que las moléculas neutras difunden en forma aleatoria por la fuente de ionización, solo una porción es ionizada.

Para compuestos no volátiles, los iones de la molécula intacta son producidos al pasar la solución por un campo eléctrico (electrospray ionization), por bombardeo de partículas (fast atom bombardment) o por interacción con especies fotoexcitadas (matrix-assisted laser desorption). Después de producirse, los iones pasan al analizador y gracias a que tienen carga eléctrica pueden controlarse por campos eléctricos y ser separados por su valor m/z en el analizador de masas. Los iones son analizados de acuerdo a su abundancia a lo largo de la escala m/z . Durante el proceso de adquisición de datos provenientes del detector, los datos pueden organizarse en forma tabular o en formato de gráfica de barras para dar finalmente el espectro de masas de la muestra analizada.

Dada la complejidad de los diferentes componentes del espectrómetro, en la Tabla 11 se muestran los componentes y sus variantes principales.

Ya que la configuración del equipo dependerá en su mayoría del tipo de sustancia a identificar y de la sucesión de metodologías en el proceso de estudio, el analista deberá decidir cuál es la configuración idónea para sus propósitos ya que cada uno de los componentes presenta ventajas y desventajas entre sí o diferencias en la precisión de los resultados al estar acopladas a otras técnicas analíticas.

Tabla 11. Componentes y variantes de un Espectrómetro de Masas.

Componente	Variante
Sistema de Entrada	*Directo. *Indirecto. *Columna capilar.
Fuente de Iones	*Impacto electrónico (EI). *Ionización Química (CI). *Ionización de Campo (FI). *Desorción de Campo (FD). *Bombardeo con Átomos Rápidos (FAB). *Electrospray (nanospray y microspray) (ESI). *Ionización/Desorción por Láser Asistida por Matriz (MALDI)
Analizador de Masas	*Cuadripolo (Quadrupole). *Trampa de Iones (IT). *Tiempo de Vuelo (TOF). *Ciclotrón de Resonancia Iónica por Transformada de Fourier (FTICR).
Detectores de Iones	*Copa Faraday (FCD). *Multiplicador de Electrones (EMD). *Detector Daly (DD). *Detector de Microcanales (MCD).

Identificación.

Existen dos métodos para comprobar la identidad de una sustancia desconocida o de una mezcla de sustancias a través de la espectrometría de masas. Cuando se trata de sustancias ya purificadas o libres de interferencias, los análisis pueden realizarse de forma inmediata en el espectrómetro, sin embargo, si se desconoce la naturaleza de la muestra a analizar, es preferente que la espectrometría de masas esté acoplado a una técnica de separación previa su inyección en el espectrómetro. En este último caso, las muestras podrán ser

inyectadas en el equipo en cuanto salgan de la técnica de separación ya que de esta forma se asegura la inyección de las fracciones de cada sustancia de forma aislada.

El primer método de identificación se realiza empleando todos los fragmentos obtenidos de la espectrometría y empleando una serie de reglas diseñadas para este propósito con las cuales se pueden hacer conjeturas para llegar a la estructura posible de la sustancia. Por este método es posible conocer el peso molecular de la sustancia al sumar todos los iones presentes en la espectrometría. En algunos casos, como el malatión en la Figura 21 puede aparecer la molécula completamente intacta cargada positivamente de forma tal que puede conocerse inmediatamente el peso molecular de la sustancia (ion molecular).

Analizar la estructura de la molécula a través de cada uno de los iones obtenidos puede arrojar estructuras poco coherentes con la supuesta sustancia, si es que se sospecha de alguna en particular, sin embargo, obtener estructuras coherentes cuando se analizan muestras desconocidas implica que esta estructura tenga una validez mayor frente a los análisis en los que solamente se centra la técnica analítica para la detección de ciertos iones.

El segundo método de identificación, empleado con mayor frecuencia por los expertos en la técnica, es la comparación del espectro con los almacenados en alguna biblioteca digital o base de datos para tales fines. Un gran número de centros de investigación y análisis crean sus propias bibliotecas formando grupos de compuestos con base en alguna de las propiedades de las sustancias o de alguno de sus grupos funcionales de interés. De esta forma es común que en los centros de análisis forense, por ejemplo aquellos en los que se realizan estudios toxicológicos forenses, se cuente con bibliotecas de espectros obtenidos en estas instalaciones con sus propios equipos y empleando sustancias puras de los xenobióticos de interés común en las investigaciones de esta área para emplearlos como referentes en los análisis posteriores.

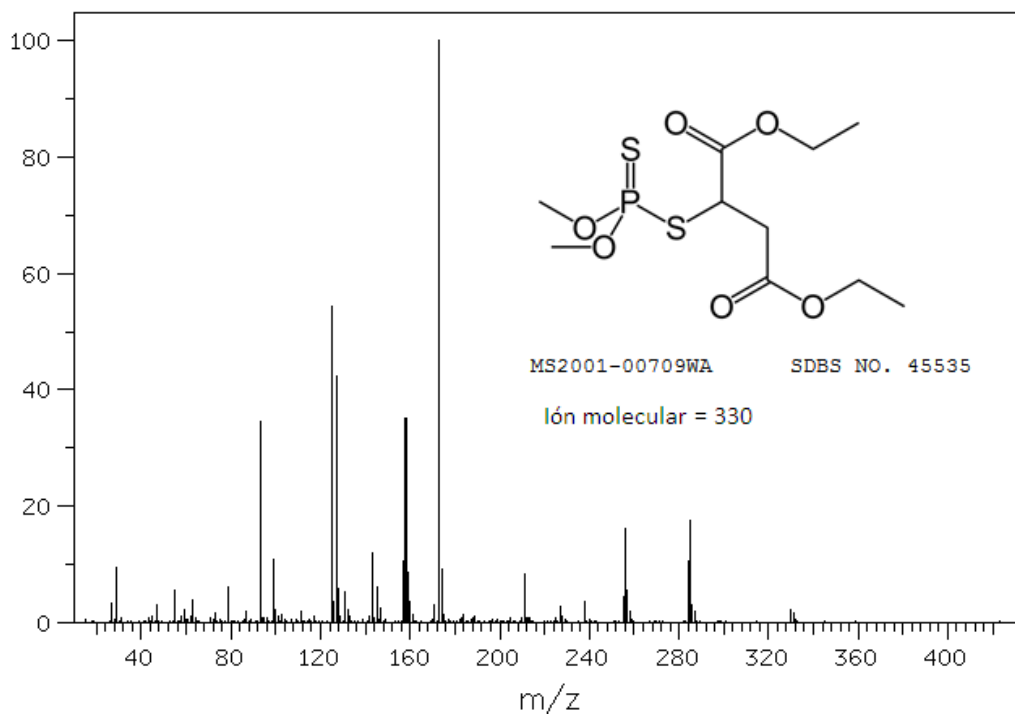


Figura 21. Espectro de masas de malatión.

Además de las bibliotecas personales que se pueden crear en cada dependencia, es posible adquirir bibliotecas de espectros como la biblioteca de “Maury, Pflieger, Weber Library of drugs”, la cual, hasta el año 2002, contaba con un total de 10,000 espectros de referencia de drogas, o la biblioteca de “The National Institute of Standard and Technology” la cual cuenta con más de 100,000 espectros de una gran diversidad de compuestos.

Esta forma de identificación computarizada a partir de la comparación digital de los espectros presenta resultados sumamente rápidos y confiables ya que la mayoría de los programas están diseñados para mostrar los diez espectros que mejor concuerden con los análisis realizados en el equipo. La identificación por comparación puede realizarse también al obtener primero el espectro de un patrón puro de la sustancia que se sospecha esté contenida en la muestra desconocida y después compararlo con el espectro obtenido en el mismo equipo de esta muestra y verificar si presenta el mismo comportamiento en su espectro, en este proceso se verifica la correlación fragmento por fragmento (1a=1p; 2a=2p; etc.) [42].

Cuantificación.

Los métodos de cuantificación en espectrometría de masas son considerablemente parecidos a los mostrados anteriormente para el caso de la cromatografía de gases y de líquidos. De igual manera puede emplearse el método del estándar interno o del estándar externo, presentando mejores resultados las cuantificaciones realizadas por estándar o patrón interno en conjunto con una curva de calibración.

La diferencia significativa entre las técnicas antes mencionadas y la espectrometría de masas es la naturaleza de los patrones internos ya que en la presente técnica es preferible emplear sustancias que estén marcadas isotópicamente, por ejemplo, los estándares deuterados son una de las mejores opciones para cuantificaciones realizadas en técnicas acopladas como la CG-MS. Estos estándares tienen las características deseadas en la CG ya que los compuestos deuterados presentan los mismos tiempos de retención y emplean los mismos pasos de preparación de muestras que los patrones no deuterados. Además de esto, pueden cuantificarse analitos que son productos de derivatizaciones logrando con este tipo de compuestos un doble beneficio en ambas técnicas ya que el compuesto deuterado puede emplearse como estándar interno en la CG y puede ser identificado en la MS gracias a que presenta un peso atómico más elevado que el del hidrógeno, así por ejemplo, la anfetamina puede analizarse y cuantificarse por CG-MS, empleando una derivatización por acilación con un compuesto deuterado en la CG que puede ser empleado también en la MS como estándar interno [42].

2.2. Espectroscopía Atómica de Absorción (AAS).

La Espectroscopía Atómica de Absorción (AAS), es una técnica que consiste en transformar la muestra desconocida (que puede encontrarse en disolución o

sólida) en átomos en estado vapor y medir la radiación electromagnética absorbida por dichos átomos.

La radiación electromagnética es un tipo de energía que toma varias formas, de las cuales las más fácilmente reconocibles son la luz y el calor radiante. La mayor parte de la información útil se obtiene operando en la región del UV, visible y rayos x. Como se observa en la Figura 22, los espectros atómicos están constituidos por picos estrechos y bien definidos que se originan por transiciones entre los diferentes niveles de energía electrónica, estas líneas de resonancia tienen origen en el estado basal y un destino en diferentes estados excitados[81].

La absorción atómica es el proceso que ocurre cuando átomos de un elemento en estado fundamental absorben energía radiante a una longitud de onda específica. La cantidad de radiación absorbida aumenta al incrementar el número de átomos del elemento presentes en el “campo óptico”, esto permite utilizar a la absorción atómica con fines cuantitativos gracias a su selectividad y precisión en los análisis. Este método puede detectar cantidades muy bajas de sustancia en el orden de 10^{-14} gramos y se emplea ampliamente en la detección y cuantificación de metales, entre otros analitos [82].

La espectroscopía atómica puede dividirse en tres clases:

- Espectroscopía Atómica de Absorción.
- Espectroscopía Atómica de Emisión.
- Espectroscopía Atómica de Fluorescencia.

La espectroscopía de emisión será tratada más adelante cuando se hable de la técnica ICP, mientras que la espectroscopía atómica de fluorescencia no será revisada en el presente manual.

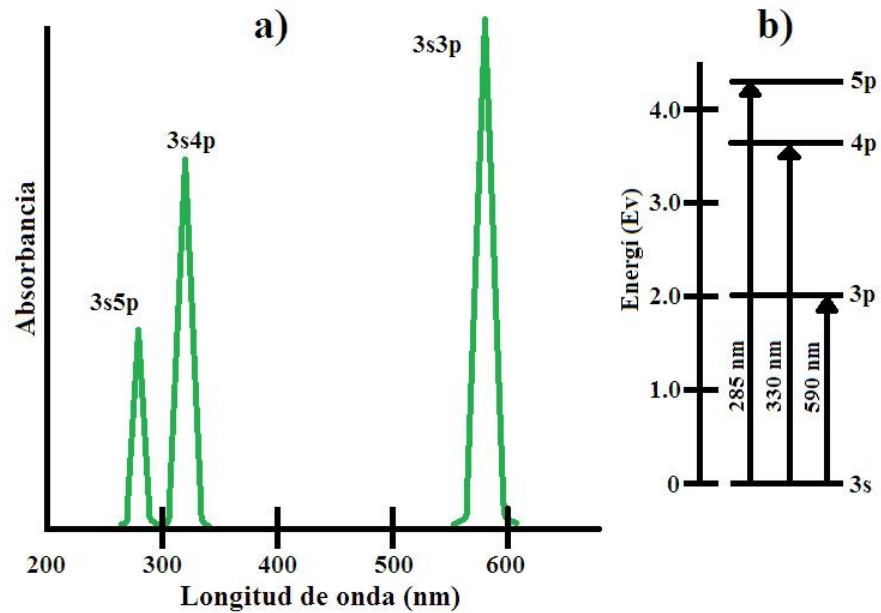


Figura 22. Espectro de absorción atómica del sodio (a). Transiciones electrónicas del sodio que generan el espectro de absorción atómica (b).

Entre las muestras que se pueden analizar con la técnica de absorción atómica se encuentran las rocas, suelos, aguas, vegetales, muestras biológicas, productos petrolíferos, metales y sus aleaciones, combustibles nucleares, productos farmacéuticos, vinos, entre otras. La ventaja que presenta esta técnica es que los fluidos biológicos como la orina, sangre, entre otros, pueden introducirse directamente en el equipo después de una simple dilución. Entre los aditamentos especiales que pueden emplearse para este tipo de muestras se encuentra el horno de grafito que permite la obtención de una vaporización más efectiva reduciendo la cantidad de muestra utilizada.

La desventajas que presenta es que los mejores resultados se obtienen con analitos metálicos o metaloides y ampliar la variedad de elementos de estudio resulta muy costoso. El otro inconveniente es que al usar una llama como vaporizador, se desperdicia aproximadamente el 90% de la muestra.

Aun con la desventaja antes mencionada, la espectroscopía atómica de absorción en flama (FAAS), es a la fecha la técnica más ampliamente utilizada en muchos campos, incluida la toxicología forense, especialmente para la

determinación o confirmación de exposiciones a metales pesados como el plomo o para la verificación de deflagraciones de armas de fuego en las que es preciso identificar y cuantificar la presencia de plomo y bario como subproductos de la detonación de la pólvora contenida en las municiones.

El acoplamiento de un equipo de AAS a un horno de grafito y a un generador de hidruros permite alcanzar límites de detección que oscilan en el orden de los ppb (partes por billón), lo cual es un requerimiento indispensable en áreas de estudio como la toxicología (clínica o forense), contaminación ambiental (incluida también la toxicología animal), análisis de alimentos, aguas potables, aguas residuales, etc.

Equipamiento.

Los componentes básicos de un espectrómetro atómico de absorción pueden observarse, de manera simplificada, en la Figura 23.

A grandes rasgos, un espectrómetro atómico de absorción debe estar compuesto de:

- Una fuente de radiación que emita una línea espectral específica correspondiente a la necesaria para efectuar una transición en los átomos del elemento analizado.
- Un nebulizador, que por aspiración de la muestra, forme pequeñas gotas para una atomización más eficiente.
- Un quemador en el cual, por efecto de la temperatura alcanzada en la combustión y por la reacción de combustión, se favorezca la formación de átomos a partir de los componentes en solución.
- Un sistema óptico que separe la radiación de longitud de onda de interés, de todas las demás radiaciones que entran al sistema.
- Un detector o transductor que sea capaz de transformar, en relación proporcional, las señales de intensidad de radiación electromagnética, en señales eléctricas o de intensidad de corriente.

- Un amplificador o sistema electrónico, que como su nombre lo indica, amplifica la señal eléctrica producida, para que en el siguiente paso pueda ser procesada con circuitos y sistemas electrónicos comunes.
- Un sistema de lectura en el cual la señal de intensidad de corriente, sea convertida a una señal que el operador pueda interpretar (por ejemplo: transmitancia o absorbancia). Este sistema de lectura puede ser una escala de agua, una escala de dígitos, un graficador, una serie de datos que pueden ser procesados a su vez por una computadora, etc.

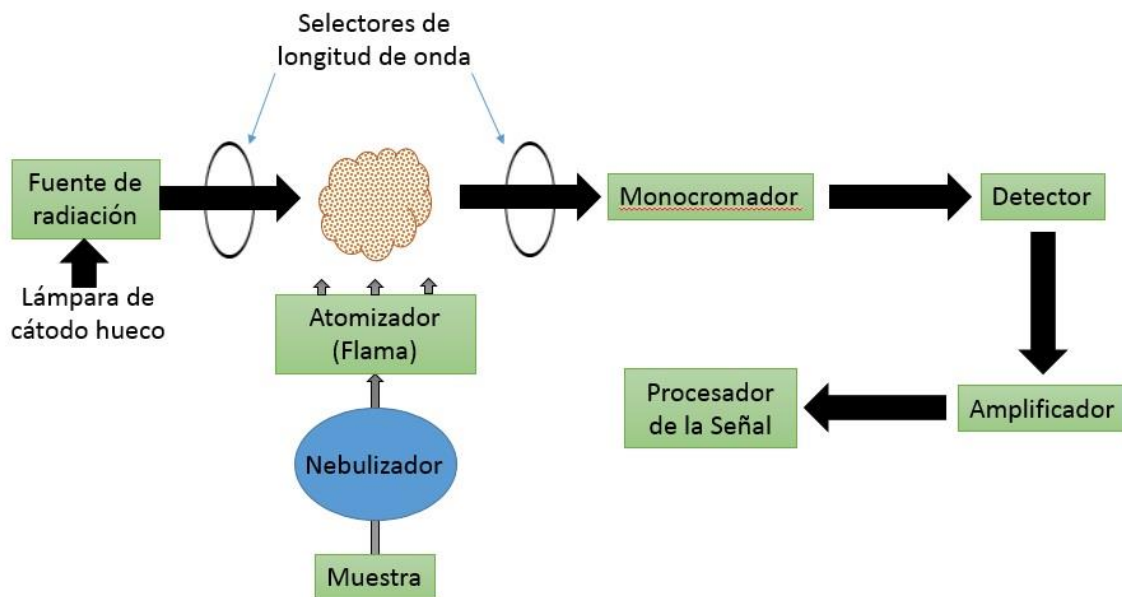


Figura 23. Esquema de un Espectrómetro Atómico de Absorción en flama.

Dado que existe una gran variedad de configuraciones para realizar los análisis por esta técnica, sería poco práctico describir las variantes en forma detallada, sin embargo, las variantes en las configuraciones se dan en dos puntos principales de la técnica que son la forma de atomización y la introducción de la muestra que dependerá de los nebulizadores principalmente, así que se mostrarán las variantes en las siguientes tablas.

Además de los atomizadores de flama, existen otros tipos de atomizadores que difieren en su temperatura de atomización los cuales son:

Tabla 12. Tipos de atomizadores en un Espectrómetro Atómico de Absorción.

Tipo de atomizador	Temperatura de atomización (°C)
Flama	17000-3150
Evaporación electrotérmica	1200-3000
Plasma de argón acoplado en forma inductiva	4000-6000
Plasma de argón de corriente directa	4000-6000
Plasma de argón inducido por microondas	2000-3000
Plasma de descarga luminiscente	No térmico
Arco eléctrico	4000-5000

Por su parte, la introducción de la muestra dependerá de los diferentes tipos de nebulizadores. En la siguiente tabla se muestra la relación entre cada uno de ellos:

Tabla 13. Tipos de nebulizadores en un Espectrómetro Atómico de Absorción.

Método	Tipo de Muestra
Nebulizador neumático	Solución o lechada
Nebulizador ultrasónico	Solución
Vaporización electrotérmica	Sólido, líquido o solución
Generación de hidruros	Solución (Elementos particulares)
Inserción directa	Sólido o polvo
Ablación láser	Sólido o metal en estado elemental
Ablación por chispa u orca	Sólidos conductores
Chispa de descarga luminiscente	Sólido conductor

La generación de hidruros se emplea solamente para ciertos elementos particulares los cuales son: arsénico, antimonio, estaño, selenio, bismuto y plomo, esto debido a que el procedimiento aumenta los límites de detección, de estos elementos en particular, en un factor de 10 a 100.

Dado que la toxicidad de estos metales en particular son de gran interés en el área forense tanto por exposiciones intencionales como laborales, su detección

en niveles sumamente bajos es de principal atención en el área de análisis por espectroscopía atómica de absorción [81].

En términos generales, en los análisis por FAAS, la muestra en forma líquida es aspirada a través de un tubo capilar y conducida a un nebulizador donde se desintegra y forma microgotas. Las gotas formadas son conducidas a una flama, ahí se produce la formación de átomos que absorberán cualitativamente la radiación emitida por la lámpara de cátodo hueco y la cantidad de radiación absorbida será proporcional a la cantidad de sustancia contenida en la muestra. La señal de la lámpara, una vez que pasa por la flama, llega a un monocromador que tiene la finalidad de discriminar todas las señales que acompañan la línea de interés. Esta señal de radiación electromagnética llega al detector y pasa a un amplificador para llegar finalmente al sistema de lectura o procesador de la señal.

Cuantificación.

La técnica FAAS no tiene la propiedad de poder emplearse como método de identificación o cualitativo ya que es preciso seleccionar la longitud de onda específica para el análisis de cada elemento; dadas estas condiciones, los análisis realizados por esta técnica deberán estar enfocados en algún elemento en particular, así por ejemplo, si se desea confirmar o descartar la presencia de plomo en la sangre, o alguna otra matriz de interés, los análisis se realizarán a la longitud de onda específica con la finalidad de cuantificar el analito. Si como resultado se obtiene una cuantificación negativa, automáticamente se descarta la presencia del metal en la matriz. Por otro lado, si el análisis arroja una cantidad del metal presente, será labor del toxicólogo reportar la concentración y la presencia del metal para los fines que hayan sido requeridos los estudios.

El análisis cuantitativo es semejante al realizado en espectroscopía UV y visible. Para esto se prepara una serie de estándares y se hace una curva de calibración, después de obtener esta curva y con base a esta gráfica y su regresión lineal, se determina la concentración de la(s) soluciones problema por medio de una interpolación en la gráfica.

Otro método de cuantificación es la adición de estándares. Es importante aclarar que las propiedades físicas de la solución a aspirar hacia la flama, deberán ser similares entre las soluciones problema y las soluciones estándar ya que de lo contrario, la eficiencia en la atomización de la solución será diferente y esto conducirá a resultados erróneos. El fundamento de este método consiste en agregar volúmenes iguales de muestra problema a muestras estándares de concentración conocida. Con estas adiciones se busca homogeneizar las propiedades físicas de las soluciones que se aspiran al quemador y optimizar las mediciones sobre la muestra problema.

Con este tipo de cuantificación es posible medir hasta 82 elementos, siempre de forma individual, con límites de detección, para algunos elementos, inferiores a los ppm.

2.3. Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP).

La técnica de Plasma de Acoplamiento Inductivo, o mejor conocida como “Espectroscopía Atómica de Emisión” (AES), se basa en medir la intensidad de una línea espectral de emisión específica del elemento que se desea determinar. Cuanto mayor sea la intensidad de ésta línea mayor será su concentración.

El fundamento de la técnica es similar al fenómeno de absorción, sin embargo, en este caso, una vez excitados los átomos a niveles energéticos más elevados, su energía tiene un tiempo de vida, después del cual, la energía empieza a descender y durante su regreso al estado electrónico basal, los átomos y moléculas emiten la radiación característica de los componentes de la muestra.

El ICP funciona usando un plasma de argón en el que se introduce una muestra en disolución, en polvo o sólida y es atomizada. La muestra se ioniza en el plasma y los iones emiten luz a diferentes longitudes de onda características que posteriormente se miden.

El argón necesita que los niveles de oxígeno y de agua sean bajos, ya que tienen un efecto de apantallamiento sobre la señal de algunos metales que da lugar a falsas lecturas bajas. También necesita que sean bajos los niveles de

hidrocarburo, puesto que pueden dar lugar a depósitos de carbono sobre el espejo, lo cual reduciría la potencia de la señal [81].

Los análisis ICP presentan menor interferencia entre elementos como consecuencia directa de sus temperaturas más elevadas. Se pueden obtener buenos espectros para más de 78 elementos con las mismas condiciones de excitación, y como resultado, es posible registrar simultáneamente los espectros para docenas de elementos. Permiten la determinación de concentraciones bajas de elementos que tienden a formar compuestos refractarios, es decir, compuestos que son muy resistentes a la descomposición térmica, tales como boro, fósforo, uranio, circonio, niobio. Permite la determinación de no metales como cloro, bromo, yodo y azufre. Los análisis son aplicables en unos intervalos de concentración que abarcan varios órdenes de magnitud y comparados con los análisis tipo FAAS, los análisis ICP presentan menores tiempos de análisis.

Por otro lado, el equipamiento es más caro, en términos generales, porque presenta mayor coste de operaciones que las técnicas de FAAS y una menor precisión que estas últimas.

Los análisis ICP proporcionan datos analíticos mucho mejores que otras fuentes de emisión. La calidad de estos resultados radica en la gran estabilidad, bajo ruido, poca radiación de fondo y en la ausencia de interferencias de las fuentes, cuando se opera en las condiciones experimentales apropiadas.

Esta técnica se emplea para una amplia variedad de aplicaciones, ya que un gran número de elementos pueden ser determinados rápidamente a nivel de trazas (ppm oppb), y porque una amplia variedad de tipos de muestras pueden analizarse utilizando ICP.

En toxicología ambiental, algunas de las muestras que se pueden analizar son los suelos, fertilizantes, matrices vegetales, alimentos, etc. En el área de toxicología clínica y forense pueden analizarse muestras de orina en búsqueda de cromo, níquel y cobre; en sangre puede analizarse la presencia de aluminio, plomo y mercurio; en heces también puede analizarse cromo; la leche materna sirve para el análisis de níquel; y en huesos pueden hacerse determinaciones de boro, fósforo, azufre y plomo; etc.

ICP puede emplearse también para el estudio de aguas contaminadas y para evaluar la contaminación del subsuelo o el aire, sin embargo, en estas áreas se necesita un tratamiento previo de las muestras con digestiones ácidas y microondas. Incluye también el estudio de suelos, sedimentos, tejidos animales, muestras vegetales, hueso y varios tipos de aguas [81].

Equipamiento.

Existen dos tipos de instrumentación fundamentales, los Instrumentos Secuenciales y los Instrumentos Multicanal.

Los Secuenciales son menos complejos y, por lo tanto, más baratos. Miden intensidades de línea una por una. Se programan para ir de la línea de un elemento a la de otro, parando el tiempo suficiente para obtener una relación señal/ruido satisfactoria.

Los Multicanal se diseñan para medir simultáneamente las intensidades de las líneas de emisión de un gran número de elementos. Cuando se han de determinar varios elementos, es evidente que el tiempo de excitación será bastante mayor con los instrumentos secuenciales; por ello, aunque estos instrumentos son más simples, resultan caros en términos de consumo de muestra y tiempo.

Independientemente del tipo de instrumento, la ionización de la muestra se logra gracias a que se emplea como fuente un plasma de argón.

El plasma es un gas ionizado, eléctricamente neutro, confinado en un tubo de descarga. En su aplicación espectroscópica se denomina plasma a un gas parcialmente ionizado (basta con que lo estén el 1 % de sus átomos o moléculas), eléctricamente neutro en su conjunto y confinado en un campo electromagnético, existiendo un equilibrio entre partículas cargadas y neutras. Existen diferentes tipos de plasma en función de la forma de conseguir dicho equilibrio. Los campos magnéticos pueden interaccionar con los plasmas. Una de estas interacciones es un acoplamiento inductivo de campos magnéticos variantes en el tiempo con el plasma.

En el plasma ICP, la ionización se realiza mediante una corriente inducida de alta frecuencia. Las temperaturas en un plasma ICP son muy elevadas (4000-10000° K) y son suficientes para disociar las combinaciones químicas estables, incluso los óxidos refractarios, eliminándose las interferencias químicas. Estos plasmas pueden estar o no en equilibrio termodinámico. Para conseguir la ionización se hace circular el gas por una serie de tubos concéntricos, que constituyen la "ANTORCHA", pieza clave en un equipo de plasma. Al final de la misma se encuentra una bobina de inducción, alimentada por un generador de alta frecuencia. En principio, es necesario iniciar la ionización del gas utilizando un medio auxiliar, chispa Tesla que luego se mantiene por la corriente de alta frecuencia que fluye a través de la bobina de inducción. El efecto es la aparición de un campo magnético, que induce a los iones y electrones a moverse en órbitas circulares, creando corrientes eléctricas, que a causa del efecto Joule ocasionan un calentamiento de los gases, alcanzándose temperaturas de hasta 10000° K, y proporcionan la continuidad del plasma.

En el extremo de la antorcha aparece, debido a los átomos ionizados, una especie de "llama" que se observa durante todo el proceso del ensayo. Como consecuencia de este diseño de la antorcha, las zonas axiales son relativamente frías, si se comparan con las circundantes y es, por tanto, a través de ellas por donde se inyectan las muestras dentro de la fuente de excitación y atomización, en forma de aerosol.

El sistema se basa en la observación de los espectros de emisión; los átomos excitados o ionizados emiten radiaciones (características para cada elemento) en forma de luz. La luz emitida pasa por un monocromador que aísla la longitud de onda específica para el análisis deseado. Un fotodetector mide la potencia de la radiación seleccionada, que entonces se amplifica y es enviada a un dispositivo de lectura o medición y a un registrador o sistema con microcomputadora.

Los elementos básicos de un equipo ICP se observan en la Figura 24.

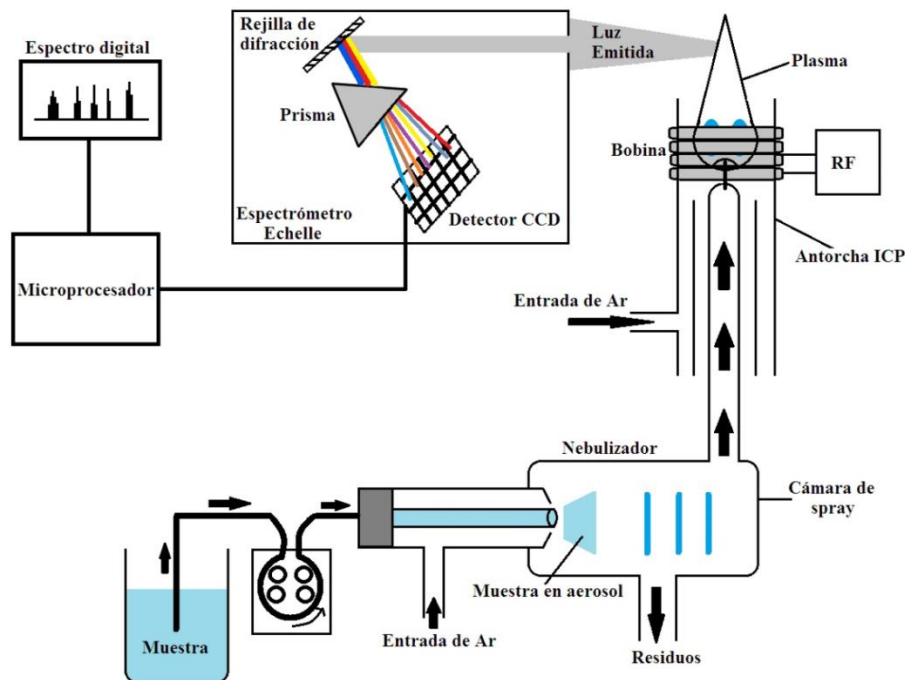


Figura 24. Esquema de un Espectrómetro Atómico de Emisión ICP.

El gas generador de plasma más empleado es el argón para el cual existen diferentes tipos de plasma que se pueden emplear en esta técnica, algunos de ellos son:

- Plasma de electrones libres.
- Plasma de iones argón.
- Plasma de átomos argón excitados (dos especies en estado metaestable).
- Plasma de átomos de argón en estado fundamental.
- Plasma de moléculas de argón ionizadas y neutras.

Por su parte, dado que del diseño de la antorcha depende la configuración del equipo, se pueden identificar dos tipos generales de antorchas:

- **Monobloc:** con tres tubos soldados formando una unidad.
- **Desmontable:** con tubos independientes. Esto permite emplear un inyector de diferente material para muestras ácidas al 50% de ácido clorhídrico, ácido

nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido fluorhídrico y agua regia (inyector de cerámica).

En cuanto a los sistemas ópticos del espectrómetro, pueden emplearse dos configuraciones primordiales con la finalidad de separar cada una de las radiaciones recibidas por equipo. Estas son:

- ❖ **Policromáticos:** Para equipos multicanales con una sola rendija de entrada y varias de salida (red de difracción fija).
- ❖ **Monocromáticos:** para equipos secuenciales con una rendija de entrada y solo una de salida (red de difracción móvil).

Dependiendo de la configuración elegida por el analista, la técnica de ICP, presenta mejores resultados frente a las técnicas de FAAS, por ejemplo, los límites de detección en ICP para elementos refractarios son mucho mejores que en FAAS gracias a que la temperatura del plasma permite tener una linealidad mayor, sobrepasando este parámetro en FAAS. Para ICP estos límites de detección van de las centésimas de ppm, mientras que para FAAS es del orden de cientos de ppm para los compuestos antes nombrados [83].

Identificación.

A diferencia de los métodos basados en fenómenos de absorción como el caso de FAAS, la técnica ICP permite realizar análisis cualitativos gracias a que el fenómeno de estudio, son las emisiones de radiación electromagnética, es decir, la emisión de luz con longitud de onda particular para cada elemento.

De la misma forma en que la energía que es absorbida por un elemento está cuantificada y es específica para ese elemento en particular, la energía irradiada o de emisión es específica para cada especie o elemento. Gracias a que la energía de emisión específica está cuantificada, es posible relacionar dicha energía con una longitud de onda que por consiguiente es específica también.

Como en la técnica de ICP se pueden excitar varios elementos contenidos en la muestra a analizar al mismo tiempo y se puede registrar de forma independiente cada una de las emisiones, los análisis cualitativos no requieren del conocimiento de la naturaleza de la muestra. En las técnicas de absorción no es posible realizar análisis cualitativos ya que si una muestra está compuesta por varios elementos y se irradia una sola longitud de onda que no corresponda a la requerida para la excitación de los elementos, ninguno de ellos presentará el fenómeno de absorción por lo cual no podrán ser identificados y su presencia no podrá ser confirmada o denegada. Debido a que las posibles combinaciones de composición de una muestra problema son prácticamente infinitas y que los equipos de FAAS miden una sola longitud de onda absorbida a la vez, resulta prácticamente imposible realizar un análisis cualitativo a través de los fenómenos de absorción, sin embargo, el fenómeno de emisión puede ser registrado una vez que los elementos han sido excitados y dependiendo de las longitudes de onda registradas, estas podrán ser relacionadas con un elemento en particular, permitiendo la identificación de cada elemento de la muestra.

La mayoría de los elementos tienen varias líneas significativas que se pueden utilizar para su identificación y cuantificación. Estos valores se pueden encontrar en la bibliografía, para más de 70 elementos indicando la longitud de onda específica con tres cifras decimales. Algunos ejemplos se pueden observar en la Tabla 14.

De esta manera, una vez determinadas las longitudes de onda de los diferentes componentes de una muestra problema, podrá compararse con las reportadas en la literatura o las encontradas en las bases de datos y de esta manera, asignar la identidad para cada uno de estos componentes[81].

Tabla 14. Longitudes de onda características para algunos metales.

Elemento	Longitudes de onda Características (nm)
Arsénico	193.759
Wolframio	207.914 209.481 224.883
Cadmio	228.802 214.438
Cromo	267.716
Níquel	231.604
Plomo	220.353
Escandio	424.683
Litio	232.261 460.292

Cuantificación.

Para la cuantificación a través de la técnica de ICP, lo más conveniente es realizarla con un acoplamiento a otra técnica espectrométrica, idealmente la espectrometría de masas, ya que la interpretación cualitativa no requiere de una exactitud o precisión tan elevada como la cuantificación que generalmente se realiza a nivel de trazas y los espectros de la técnica sencilla de ICP presentan, generalmente, grandes interferencias o muestran una presencia de ruidos muy elevados como para medir las intensidades de las señales obtenidas; mientras que los espectros de la técnica ICP-MS, presentan picos definidos sin interferencias en las determinaciones de los elementos de una muestra problema.

En la Figura 25, se puede observar la diferencia substancial de un espectro de ICP sin acoplamientos (espectro óptico de emisión "a"), y de un espectro ICP-MS.

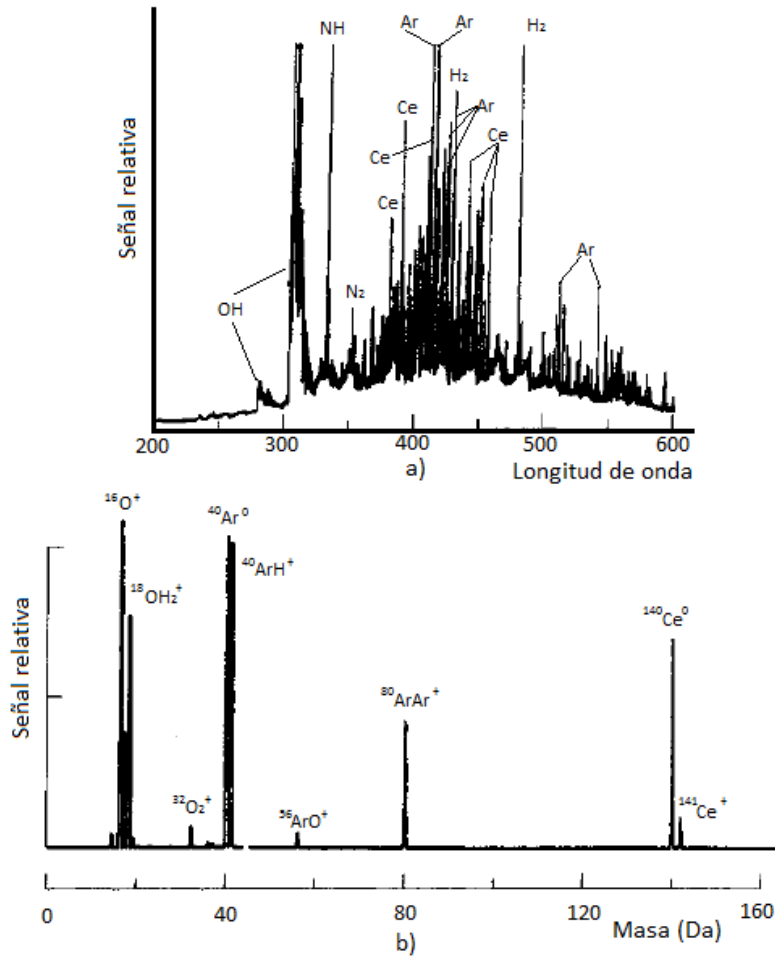


Figura 25. Comparación de espectros entre la técnica de ICP e ICP-MS.

A pesar de que el acoplamiento entre ambas técnicas reduce la presencia de interferencias y de ruido, no son infalibles ni libres de presentar alguna de ellas dos. La diferencia de las interferencias radica en que el acoplamiento presenta interferencias isotópicas entre moléculas del mismo peso y carga, aunque diferente especie, lo que ocasiona que ambas tengan la misma relación masa/carga, lo que imposibilita la detección independiente de las especies. Otra interferencia es debida a la recombinación que existe entre los átomos de las especies ionizadas, así pues, al haber una recombinación del tipo $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, interferirá con la especie $^{51}\text{V}^+$. Finalmente, pueden existir también interferencias por iones de doble carga, por ejemplo, $^{48}\text{Ca}^{2+}$ que interfiere con la determinación de $^{24}\text{Mg}^+$ [42].

Una vez teniendo en mente las consideraciones necesarias por las interferencias que se presentan en el acoplamiento de las técnicas, la cuantificación de analitos puede realizarse, como en las demás técnicas, por el empleo de un patrón interno, combinado con el uso de una curva de calibración que le proporcione a los resultados obtenidos tanto precisión, como exactitud por el comportamiento lineal que le proporciona la técnica ICP al análisis. En este método la curva de calibración se realiza entre el recuento de iones para el analito respecto al patrón interno, en función de la concentración de las disoluciones estándar y el patrón interno. Generalmente, las gráficas log/log de la corriente iónica, el recuento de iones o la relación de intensidades del estándar y del patrón interno, como la que aparece en la Figura 26, son lineales en varios órdenes de magnitud de concentración. En estas curvas de calibración se emplea la línea de itrio a 242.2 nm como patrón interno. Con este patrón interno se observa que no existe interferencia entre los elementos a cuantificar y se mantiene una linealidad en más de un orden de magnitud de concentración.

Existe otro método de cuantificación adicional a los métodos tradicionales que es llamado “método de cuantificación por dilución isotópica”, con el cual se obtienen resultados de mayor exactitud y mucho más selectivos, sin embargo, se aplica con algunas reservas debido a que requiere el empleo de soluciones de isótopos radiactivos y el manejo de este tipo de materiales resulta ser complicado en el momento de realizar análisis de rutina. Aún con sus reservas, el método consiste en medir la variación de la relación de las intensidades de la señal de dos isótopos de un elemento que resultan de la adición de una cantidad conocida (adición spike), de una disolución patrón que es enriquecida con uno de los isótopos radiactivos de dicho elemento (a esta disolución se le denomina trazador). Así pues, la abundancia de los tres isótopos en la mezcla es intermedia entre muestra y trazador y depende de la cantidad de trazador y la inicial en la muestra.

Dentro de la toxicología forense puede aplicarse este método cuantitativo cuando se trata con exposiciones a plomo ya que el ^{210}Pb , es un isótopo radiactivo con la estabilidad necesaria que permite realizar disoluciones isotópicas medibles [84].

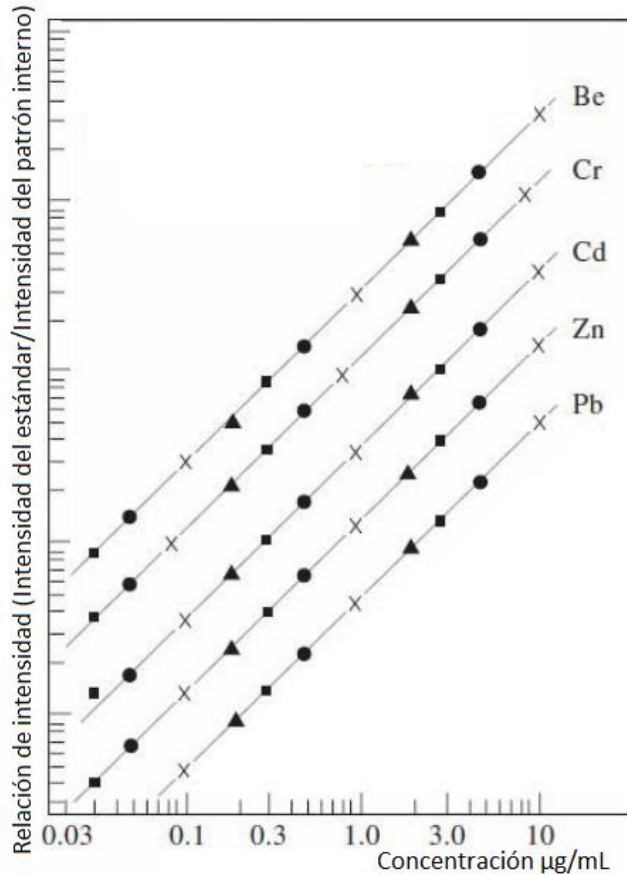


Figura 26. Curvas de calibración para berilio, cromo, cadmio, cinc y plomo.

Ejercicio Práctico 6.

1. ¿Qué pruebas de confirmación seleccionarías para cada analito en sus muestras?
2. ¿Cómo se realiza la identificación de su analito?
3. ¿Cómo se realiza la cuantificación de su analito?
4. Indique las condiciones bajo las que se debe realizarse dichas pruebas (equipamiento, condiciones de operación, columna, temperatura, estándares, etc).
5. ¿Cómo se realiza la cuantificación de plomo contenido en hueso?

Capítulo 6. Interpretación de Resultados Toxicológicos. Factores a considerar.

La interpretación de los resultados toxicológicos debe ser capaz de ofrecer una explicación sobre el significado y la trascendencia de los datos analíticos obtenidos en la investigación jurídica en curso. La correcta correlación de la interpretación de resultados con la realidad de los hechos acontecidos será función de la calidad de la muestra analizada y de los resultados analíticos, así como del conocimiento de la existencia de diversos fenómenos fisiológicos y de las circunstancias en las que ocurrió el suceso.

La exposición a diversas sustancias de interés jurídico ha pasado a ser un fenómeno de proporción internacional no sólo por relacionarse íntimamente con problemas de salud, sino también por las implicaciones legales de los diferentes tipos de exposición y los individuos sometidos a ellas.

El análisis de muestras biológicas adquiere, por tanto, cada día una importancia más acentuada en el área de la toxicología forense. Los laboratorios deben ser capaces de detectar cada vez un mayor número de sustancias diferentes y usar métodos de detección e identificación rápidos, además de fiables y específicos.

La interpretación de resultados toxicológicos es difícil ya que los xenobióticos y/o sus metabolitos se encuentran en muy pequeñas concentraciones y siempre existe la posibilidad de interferencias por tratarse de matrices de complejos tratamientos. Son muchos los factores a tener en cuenta en los análisis forenses, tanto relativos a la sustancia a investigar como a la matriz biológica analizada.

La integración de la información disponible sobre el caso en conjunto con los resultados analíticos constituye, por tanto, la etapa más compleja de la investigación toxicológica; por esta razón y con el objetivo de ayudar al analista en esta tarea, en el presente capítulo se muestran, de forma general, algunos de los factores más importantes que hay que considerar para conseguir una interpretación

exitosa y precisa sobre los datos obtenidos en los análisis de identificación y cuantificación de xenobióticos y sus metabolitos.

A manera de introducción, hay que recordar que el objetivo principal de un informe toxicológico ante-mórtem y post-mórtem es establecer si existe la presencia de una sustancia tóxica en las matrices biológicas analizadas y a su vez, cuantificar la concentración de este compuesto para evaluar esta información y saber si se puede explicar la causa o la manera en que ocurrió un cierto suceso que esté sujeto a una investigación. Los resultados toxicológicos presentan, por tanto, numerosas implicaciones médicas, sociales y jurídicas.

Así, se considera indispensable no concluir el informe únicamente con la expresión de la concentración del analito en la muestra analizada sino relacionarlo con información toxicocinética y toxicodinámica a fin de expresar el significado de los hallazgos en el laboratorio [85]. Sin embargo, en algunos casos, dependiendo del objetivo de la investigación, es suficiente concluir con la identificación del agente causal, por otro lado, en otras investigaciones es preferible tanto identificar al agente causal como su concentración, e igualmente será importante incluir una interpretación que dé respuesta a las hipótesis creadas en el planteamiento del problema.

Un axioma muy importante en el área forense es que ningún aspecto de la investigación debe llevarse a cabo de forma aislada, esto es particularmente importante en la interpretación de resultados toxicológicos. Debe haber comunicación entre los científicos que participen para discutir la historia del caso, la historia clínica, las prescripciones farmacéuticas y las circunstancias del suceso. Es muy importante considerar que los resultados de los análisis toxicológicos deben tener sentido y concordar con los hallazgos del caso. Por ejemplo, si el análisis de la muestra por GC/MS identifica cocaína en ausencia de sus metabolitos benzoilecgonina, metil-ecgonina y cocaetileno podría indicar que la cocaína no se encontraba originalmente en la muestra.

Una práctica muy recomendable es mantener un diálogo abierto con el patólogo y el médico, para colaborar en la interpretación de los hallazgos.

Es usual que al toxicólogo forense se le planteen las siguientes preguntas:

1. ¿Hay un tóxico involucrado?
2. ¿Cuánta sustancia se consumió?
3. ¿Cuándo lo consumió?
4. ¿Se encontraba bajo los efectos del tóxico en el momento del hecho?
5. ¿Fue la causa de muerte o afectó la conducta?

Para responder a la primera pregunta se debe aplicar la toxicología analítica y para la segunda, la tercera y la cuarta, se deben integrar a ésta los conocimientos de toxicocinética y para contestar la última pregunta, además, se deben integrar conocimientos de toxicodinamia.

Es mediante las técnicas de química analítica que se identifica y determina la concentración de un xenobiótico en un fluido o tejido; sin embargo, estimar el tiempo de consumo o las consecuencias fisiológicas de éste requiere de la integración de numerosos conocimientos y la consideración de numerosas variables. La selección de muestras es crucial puesto que la ventana de detección de analitos es diferente en las matrices biológicas, no es lo mismo encontrar un metabolito en sangre, que en orina o cabello; cada muestra estará relacionada con diferentes tiempos y frecuencias de consumo [30] por lo cual, es un hecho generalmente aceptado que la interpretación de los resultados se debe realizar teniendo en cuenta el historial médico, las circunstancias que rodean al suceso y la manera en que se produjo, los efectos probables de la concentración de la sustancia presente, la presencia concomitante de otras sustancias y la exclusión de otras causas potenciales. Además, la interpretación apropiada de las concentraciones, principalmente de la concentración sanguínea, debe tener en cuenta las limitaciones del método analítico empleado, la naturaleza de las muestras analizadas y el conocimiento de los cambios fisiológicos y/o bioquímicos ocurridos en el individuo ante-mórtem y post-mórtem [85].

Es importante mencionar que es una práctica inadecuada calcular la dosis consumida con base en la concentración sanguínea hallada en muestras post-mórtem, debido a que esta dependerá de factores que se desconocen como el volúmen de distribución (Vd) del individuo, el estado cinético de la distribución en el momento de la toma de muestra, y si es el caso, los cambios relacionados con la redistribución post-mórtem. De tal forma que preguntas como ¿Cuántas tabletas (o cualquier otra forma farmacéutica) consumió el individuo? son imposibles de resolver y bajo ninguna circunstancia deben presentarse en juicio.

Dicho lo anterior, es preciso mencionar una vez más que la disposición de los xenobióticos en los fluidos biológicos y demás matrices de análisis dependerá del proceso de absorción, distribución, biotransformación y excreción. Las propiedades físicas y químicas de las sustancias, la vía de administración, el flujo sanguíneo en la matriz biológica de interés; la concentración de la dosis, su duración y la frecuencia de exposición al xenobiótico determinará los efectos producidos en el organismo del individuo. El peso molecular, el valor de acidez del xenobiótico (pKa), el grado de unión a las proteínas y su lipofilicidad, determinará la posibilidad de encontrar los xenobióticos o sus metabolitos en las distintas matrices biológicas.

No es fácil llegar a obtener valores de referencia sobre niveles de sustancias potencialmente tóxicas en muestras biológicas humanas para los distintos xenobióticos (medicamentos, drogas de abuso, metales, disolventes, gases, plaguicidas, productos fitosanitarios y fertilizantes, reactivos químicos, etc.) debido a que existe gran variabilidad en los datos suministrados por los distintos autores. Además, las tablas de valores de referencia no suelen distinguir entre sangre total, plasma o suero, resultando muchas veces escasamente comparables.

A la hora de recurrir a una tabla de valores de referencia para distintas sustancias (concentraciones normales, habituales o terapéuticas, tóxicas y letales o post-mórtem, en sangre total, suero, plasma y orina), se debe tener en cuenta que esta referencia únicamente servirá de guía para la interpretación de los análisis cuantitativos en muestras biológicas de casos clínicos toxicológicos o forenses, de sujetos vivos o cadáveres, pero siempre es necesario tener en cuenta que los

datos de cada caso concreto no deben tomarse como valores absolutos ni de forma aislada, ya que existen innumerables variables que pueden influir en las concentraciones; por ello, deben considerarse junto con los demás factores que rodean al caso [77].

Con relación a un resultado analítico en toxicología, éstos se ven influidos por una serie de condiciones pre-analíticas (Tabla 15), relacionadas con las características de la muestra analizada, por factores relacionados con el método analítico, por factores relacionados con la sustancia de interés y con las diferencias interindividuales de la población.

Tabla 15. Condiciones preanalíticas a considerar.

Relacionados con el suceso	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de traumatismos. • Pérdida de sangre. • Nula presencia de productos séricos (orina, sudor, saliva, etc.). • Otros.
Relacionados con el tiempo transcurrido	<ul style="list-style-type: none"> • Intervalo de toma de muestras. • En casos post-mórtem, existencia de putrefacción. • Factores de redistribución. • Otros.
Relacionados con la toma y conservación de la muestra.	<ul style="list-style-type: none"> • Sitio de muestreo. • Volumen o cantidad de la muestra. • Calidad de la muestra (conservación de la muestra).
Otros	<ul style="list-style-type: none"> • Conocimiento del posible analito y su estabilidad. • Disponibilidad de otras matrices de muestreo. • Otros.

La influencia de las condiciones pre-analíticas sobre la incertidumbre de la medida de la concentración puede ser importante e incluso mayor que la incertidumbre asociada al método analítico. Por ejemplo, se ha demostrado que la incertidumbre asociada a la concentración de metadona en sangre femoral se incrementa hasta cinco veces cuando no se tienen en cuenta los factores pre-analíticos como los fenómenos de redistribución, el intervalo de tiempo desde la exposición al xenobiótico hasta la toma de muestras y la comparación de estos resultados con los obtenidos en otras matrices como sangre central ya que de no tomar en cuenta estos factores, el resultado de la cantidad de xenobiótico disponible en sangre femoral tendrá menor correlación entre la cuantificada y la cantidad a la que fue expuesto el sujeto. Por ello, la interpretación de la concentración post-mórtem no debe realizarse sin el conocimiento preciso de los procesos que afectan el valor de la concentración presente en las muestras analíticas.

Dada la influencia de las condiciones pre-analíticas sobre el resultado y con el fin de facilitar y armonizar los procesos de toma de muestra, se han publicado varias recomendaciones de homogeneización en los protocolos de muestreo. Algunas de estas publicaciones han sido emitidas por la Sociedad de Toxicología Forense Estadounidense en 2006, la Sociedad Británica de Toxicólogos Forenses y la Sociedad Alemana de Toxicólogos Forenses en 2010, La Asociación Internacional de Toxicólogos Forenses (TIAFT) en 2012, entre otros [85].

Una de las razones que hace que el análisis toxicológico sea tan complicado es que frecuentemente se pretende la determinación de cualquier sustancia que pudiera tener interés toxicológico. Esta aproximación, aunque idealista, no es útil para un laboratorio que recibe miles de casos al año. Hay que tener presente que pueden existir sustancias de difícil detección o que no están incluidas en los protocolos habituales y que solo serán determinadas si la información que concierne al caso así lo sugiere. En la práctica, resulta indispensable que el laboratorio reciba la información más completa posible, incluyendo detalles de las

circunstancias en las que ocurrió el suceso y los hallazgos de las investigaciones previas (hallazgos en las necropsias cuando sean casos post-mórtem).

Así pues, el toxicólogo forense debe conocer las limitaciones y la fiabilidad de los métodos analíticos utilizados debido a que la calidad de la interpretación dependerá de la calidad de los resultados obtenidos. En este sentido, debe saber si el método analítico empleado está correctamente validado y es lo suficientemente específico, si se utilizaron calibradores preparados en la matriz y si la calibración efectuada era válida en el intervalo de interés.

Por todo lo anterior, resulta prácticamente imposible conocer la concentración “real” del analito en las muestras y más aún, correlacionar dicha concentración con la concentración al momento del suceso en investigación, la determinación del tiempo de exposición y en los casos post-mórtem, relacionar la concentración medida en el cadáver con la concentración previa al deceso del individuo. Sin embargo, la fiabilidad del resultado aumenta con la especificidad del análisis, con la replicación del mismo o mediante la aplicación de dos técnicas analíticas basadas en principios físico-químicos diferentes. Tradicionalmente, se ha considerado la cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) como la técnica instrumental que proporciona una mayor confianza en la exactitud y la precisión del resultado analítico. Por otro lado, la obtención de un resultado negativo no implica necesariamente la ausencia de intoxicación. Este hecho puede deberse bien a una mala aplicación del método analítico o bien a la utilización de un método analítico inapropiado para la determinación solicitada.

Dentro de los factores relacionados con las propiedades de los analitos que influyen en la interpretación de resultados, se pueden listar los contenidos en la Tabla 16.

Tabla 16. Factores relacionados con las propiedades de los analitos que influyen en la interpretación de resultados

Tipo de sustancia	<ul style="list-style-type: none"> • Legal. • Ilegal.
Propiedades fisicoquímicas	<ul style="list-style-type: none"> • Liposolubilidad. • Grado de ionización.
Parámetros toxicocinéticos	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo de vida media ($t_{1/2}$). • Volumen de distribución. • Existencia de metabolitos activos. • Liposolubilidad. • Grado de ionización. • Grado de unión a proteínas plasmáticas. • Otros.
Forma de consumo o exposición	<ul style="list-style-type: none"> • Dosis. • Frecuencia del consumo o exposición. • Vía de administración. • Presencia o pérdida del factor de tolerancia (en casos particulares). • Otras.
Interacciones	<ul style="list-style-type: none"> • Consumo de otras sustancias del mismo carácter. • Consumo de sustancias con la misma vía metabólica. • Otras.

El comportamiento de los xenobióticos en el organismo está caracterizado por varios parámetros toxicocinéticos ya que de ellos dependerá la concentración de la sustancia en las diferentes regiones del organismo por lo cual, las concentraciones medidas en diferentes matrices no podrán correlacionarse entre sí de forma directa ya que algunas matrices analíticas actúan como reservorios de sustancias, mientras que otras como centros de biotransformación de los xenobióticos y/o como medios de eliminación, etc.

De los factores antes listados, el tiempo de vida media fue explicado en capítulos anteriores (Capítulo 3, sección 1.1) para los demás, se añade una breve descripción de su significado.

El volumen de distribución es una medida de la extensión del transporte de la sustancia en el organismo, es decir, es el volumen aparente (hipotético) del fluido corporal necesario para contener la cantidad total de una sustancia a la misma concentración a la que se encuentra en el plasma o en la sangre total, asumiendo que se ha alcanzado el equilibrio. Leikin y Watson [85] establecieron que cuando la relación de concentración entre la sangre central y la sangre periférica es inferior a 3, el volumen de distribución de la sustancia es elevado.

La liposolubilidad es definida por el coeficiente de partición octanol-agua. El grado de ionización de las sustancias puede verse afectado por la disminución sistémica del pH, principalmente en la sangre, alterando las propiedades físico-químicas y los parámetros toxicocinéticos que condicionan el transporte del xenobiótico a través de las membranas de las células, es decir, se relacionan con el proceso de absorción.

Por su parte, el grado de unión a proteínas plasmáticas influye drásticamente ya que los xenobióticos unidos a proteínas plasmáticas suponen un reservorio circulante de la sustancia que le permite llegar a regiones del organismo a las cuales no tendría el acceso sin esta unión proteínica.

Otro factor importante a tomar en cuenta en la interpretación de los resultados, ante-mórtem o post-mórtem, son los fenómenos de tolerancia o pérdida de tolerancia. La tolerancia es un fenómeno adaptativo que se presenta como consecuencia de la exposición continua a una sustancia y que se refleja en la necesidad de incrementar la dosis de alguna sustancia para producir el mismo efecto. Este fenómeno es reversible cuando se suspende la exposición. La pérdida de tolerancia en personas que han entrado a programas de rehabilitación puede contribuir a su muerte si se presenta una recaída y se consume la misma dosis que se solía consumir antes de ingresar al programa de rehabilitación.

En cuanto a los factores a considerar por las diferencias interindividuales, se puede decir que dada la diversidad de las personas, muchos individuos suelen reaccionar de forma distinta a una exposición determinada de un xenobiótico en particular. Entre algunos de los factores que pueden influir en los efectos manifestados se pueden citar los siguientes:

En general, se estima que los factores genéticos suponen entre el 15 y el 30% de las diferencias toxicocinéticas y toxicodinámicas interindividuales. En algunos casos, la influencia de estos factores genéticos puede llegar a ser hasta del 95%.

Tabla 17. Factores interindividuales que influyen en la interpretación de resultados.

Factores individuales	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo. • Edad. • Raza. • Masa corporal. • Factores genéticos. • Otros.
Interacciones farmacocinéticas con otras sustancias	<ul style="list-style-type: none"> • Inducción del metabolismo. • Inhibición del metabolismo. • Desplazamiento de xenobióticos. • Efectos aditivos. • Efectos sinérgicos o antagónicos.
Estado fisiopatológico	<ul style="list-style-type: none"> • Embarazo. • Enfermedades anteriores. • Presencia de heridas. • Presencia de quemaduras. • Presencia de infecciones. • Patologías previas (hepática, renal, etc.) • Otros.

Los factores genéticos se reflejan de forma importante en la biotransformación debido a que la familia enzimática del citocromo P450 presenta un elevado polimorfismo en la población. Los individuos presentan una distinta actividad metabólica, lo que determina la concentración de xenobióticos y/o sus metabolitos presentes principalmente en la sangre, aunque también influencia la concentración de las demás matrices. Así pues, la diferencia en la velocidad de biotransformación de un xenobiótico puede ser la causa de una intoxicación fatal a dosis a las cuales otro individuo no presentaría efecto alguno. Según la tasa de biotransformación de los xenobióticos, se puede clasificar a los individuos en:

- Metabolizadores ultrarrápidos.
- Metabolizadores rápidos (extensos).
- Metabolizadores intermedios.
- Metabolizadores lentos (pobres).

Se sabe que la frecuencia de los distintos alelos varía con la raza, por lo que varía también la actividad enzimática. Por ejemplo, entre el 7 y el 8% de los caucásicos es deficiente en el CYP 2D6, motivo por el que dichas personas presentan una menor actividad oxidante.

Algunos autores recomiendan la realización de la genotipificación para mejorar la interpretación de las concentraciones post-mórtem. En la actualidad, se dispone de un protocolo para determinar, en cada caso forense, la utilidad de realizar la genotipificación. Dicho protocolo se basa en el cociente de concentraciones metabolito/xenobiótico, el consumo concomitante de otras sustancias y la existencia de polimorfismo enzimático. Resulta indispensable, además, tener en cuenta la capacidad metabólica global del individuo y la ingesta concomitante de sustancias que pudieran interactuar con las enzimas metabolizadoras.

Tabla 18. Situaciones en las cuales la genotipificación puede proporcionar información adicional. Traducida de Musshoff, F. et al. 2010 [86].

Hallazgo analítico u otra información	Factores a determinar		
	<i>Está involucrada una enzima polimórfica?</i>	<i>Existen interacciones con otros fármacos</i>	<i>Se recomienda realizar genotipificación?</i>
<i>Cociente alto entre el xenobiótico y su metabolito: ¿muerte accidental o suicidio?</i>	Sí	Sí	Considerar
	-	No	Sí
	No	-	No
<i>Cociente entre el xenobiótico y el metabolito anormalmente elevado o anormalmente disminuido</i>	Sí	Sí	Considerar
	-	No	Considerar
	No	-	No
<i>Reacciones adversas en la historia clínica</i>	Sí	Sí	Considerar
	-	No	Considerar
	No		No
<i>Cociente elevado entre el xenobiótico y su metabolito: se alega que la ingesta se realizó de acuerdo a la prescripción</i>	Sí	Sí	Considerar
	-	No	Sí
	No	-	No

En el caso de muestras post-mórtem, existen factores que pueden modificar la concentración del xenobiótico y que deben considerarse en la interpretación de resultados, por ejemplo, las interacciones entre xenobióticos, el sitio del cual se toma la muestra, la fecha de toma de la muestra, la ruta de administración y el intervalo de tiempo transcurrido desde que el individuo tomó un xenobiótico hasta su muerte. Los fenómenos cadavéricos asociados con la muerte del individuo y la muerte celular traen como consecuencia una serie de cambios como: hipoxia, deficiencia de ATP y NADH, acumulación de ácido láctico, disminución del pH y del sodio intracelular, alteración de la presión osmótica y liberación de enzimas

lisosomales entre otros que afectarán la estabilidad y propiedades fisicoquímicas del analito de interés, resultando en su redistribución de éstos en los tejidos. A este fenómeno se le conoce como redistribución post-mórtem y se ha demostrado para sustancias como alcohol y cocaína [87]. La Tabla 19 muestra algunos ejemplos.

Tabla 19. Sustancias que presentan distribución postmortem

Xenobiótico	Descripción	Referencia
Morfina	Analgésico	[88]
Imipramina	Antidepresivo tricíclico	[89]
Etanol	Bebida	[90]
Difenhidramina	Antihistamínico	[91]

La redistribución post-mórtem se produce de los lugares de concentraciones más elevadas de los órganos sólidos hacia la sangre, por lo que con el tiempo ocurre una elevación de los niveles sanguíneos. Hay niveles más elevados en los vasos centrales (arteria y vena pulmonar) y en la sangre cardiaca; los niveles más bajos se obtienen en los vasos periféricos (vena subclavia y femoral).

Este fenómeno implica que las concentraciones de xenobiótico encontradas en muestras post-mórtem no son representativas de su concentración cuando el individuo estaba vivo, ya que estas concentraciones varían en función de la muestra tomada y el intervalo entre la muerte y el tiempo de muestreo. Por tanto, debe tenerse cuidado en su interpretación. Mientras mayor sea el intervalo entre la muerte y la toma de muestras mayor será el margen de error en la interpretación de los resultados. En un intento por disminuir este efecto en la interpretación, el orden preferente para la recolección es de los vasos femorales, luego los iliacos, subclavianos y finalmente el corazón.

Por otra parte, los cuerpos en descomposición presentan un incremento dramático de las concentraciones del xenobiótico en hígado, lo cual puede conducir a una interpretación errónea como causa o forma de muerte. De igual manera, los procesos autolíticos de putrefacción producen gases que pueden impulsar los xenobióticos o sus metabolitos de unos órganos o vasos sanguíneos a otros. A

estos fenómenos se añade la redistribución causada por la acción de la gravedad hacia las partes más declives del cadáver [77]. En estos casos la concentración en músculo presenta cambios menores a lo largo del tiempo con lo que esta es una matriz mucho más confiable para la interpretación de resultados.

En caso de sospecha de muerte por sobredosis es necesaria la confirmación del análisis empleando por fuerza otro fluido o tejido para realizar la determinación, por ejemplo, si se detectaron niveles letales de un xenobiótico en sangre, entonces el análisis en una muestra de hígado debe demostrar también niveles elevados para confirmar la intoxicación sistémica. De no llevarse a cabo esta confirmación se puede llegar a conclusiones erróneas.

La correcta interpretación de los resultados toxicológicos depende de la calidad de los datos analíticos y del conocimiento de los procesos. Las normas publicadas por las diferentes organizaciones profesionales internacionales recomiendan que los laboratorios de toxicología forense tengan instaurado un sistema de calidad que les permita garantizar que los resultados generados en el mismo son confiables ya que van a ser utilizados por el sistema legal en la toma de decisiones.

Un sistema de calidad describe todos los procedimientos y los criterios adoptados por el laboratorio para asegurar la integridad de la muestra recibida, la continuidad de la cadena de custodia y la trazabilidad de los resultados analíticos. La evaluación de los mecanismos de control realizado en el reino unido en el año 2001 [85] demostró cómo, a pesar de que los laboratorios participantes obtuvieron unos resultados analíticos adecuados, la interpretación de los mismos varió notablemente entre unos laboratorios y otros. Los autores reconocen la necesidad de seguir diseñando ejercicios similares en los que se evalúe la interpretación de resultados.

Una vez obtenido el resultado analítico, las normas internacionales recomiendan que, antes de realizar la interpretación, se revise todo el proceso seguido documentando la cadena de custodia, los controles realizados y la validez del resultado. Para ello, se dispone de criterios de calidad cualitativos y

cuantitativos. Sin embargo, las normas no establecen criterios para la interpretación de los resultados post-mórtem.

En el mismo sentido, la norma UNE-EN ISO/IEC17025:2005 dispone que la interpretación de resultados quedará al criterio del facultativo responsable, que tendrá que haber demostrado su competencia técnica. No obstante, la interpretación de resultados en sí misma no es acreditable.

En consecuencia, el cumplimiento de las directrices gubernamentales y las recomendaciones realizadas por asociaciones profesionales y la implantación de un sistema de calidad pueden asegurar que el proceso pre-analítico y analítico se realice con total fiabilidad; mas esto no asegura que la interpretación del resultado sea la correcta.

Por ello, en los casos en los que se carece del fundamento científico necesario para realizar la interpretación, el toxicólogo forense no debe ceder presiones externas encaminadas a que decida si una determinada concentración sanguínea es la responsable de la muerte de un individuo o no.

Ejercicio Práctico 7.

1. ¿Qué información sobre el caso debe considerar? Justifique su respuesta
2. ¿Qué información sobre el individuo debe considerar? Justifique su respuesta
3. ¿Qué aspectos sobre el muestreo debería considerar? Justifique su respuesta
4. Complete la siguiente información (cuando aplique) para cada xenobiótico encontrado:

Sustancia:	
Propiedades fisicoquímicas:	LogP:____ pKa_____
Informacion sobre la toma de muestra	Ante-mórtem _____ Post-mórtem: _____ Sitio anatómico de recolección: _____ Tiempo transcurrido desde el hecho hasta la

	recolección: _____ Condiciones de recolección, conservación y almacenamiento: _____	
Parámetros farmacocinéticos: Vía de administración: _____ Vía de eliminación: _____	T _{1/2} : _____ Unión a proteínas Vd: _____ Metabolitos: _____	
Información toxicológica:	Dosis letal media: _____ Dosis terapéutica: _____ Efectos tóxicos relevantes:	
Matrices en las que se encontró: (indique la concentración)	Sustancia sin alterar	Metabolito
	Sangre: _____, Orina: _____ Elementos pilosos: • Cabeza _____ • Axila _____ • Púbico _____ Contenido gástrico: _____ Otra (indique): _____	Sangre: _____, Orina: _____ Elementos pilosos: • Cabeza _____ • Axila _____ • Púbico _____ Contenido gástrico: _____ Otra (indique): _____
Fallas en LA CADENA de custodia		

5. En los casos donde aplique, calcule el cociente [Sustancia]/[Metabolito]
6. Comente sobre los resultados obtenidos en el análisis de cada matriz y su relación con la temporalidad de la exposición o consumo de la sustancia.
7. Comente sobre los resultados cuantitativos obtenidos en el análisis de cada matriz y su relación con un posible abuso de sustancia o dosificación letal.

8. Comenta la importancia de contar con una muestra o matriz que relacione el lugar de investigación con el agente causal detectado en matrices obtenidas de la víctima y/o bien con alguna persona física o moral de la que se sospeche.

Presentación de Casos.

Caso 1.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El Sr. Marciano Monsanto es productor de verduras, frutas y hortalizas que desde hace años vende a diferentes distribuidoras comerciales de alimentos. Recientemente firmó un contrato de compra-venta con la distribuidora de **alimentos orgánicos** “La Nueva Era” en el que se comprometía a entregar productos “orgánicos”.

Después del primer pedido, la distribuidora ha presentado una denuncia por fraude acusando al Sr. Monsanto de uso de plaguicidas en sus productos, mencionando el supuesto uso de malatión, metomilo y/o maloxón. La carpeta de investigación contiene las pruebas testimoniales de las partes, ambas se contradicen. El Ministerio Público solicitó una prueba de polígrafo en la que se cuestionó al Sr. Monsanto sobre el uso de plaguicidas, misma que no mostró cambios durante las negativas del acusado. Ante tal circunstancia, se solicita la intervención de un toxicólogo forense para que, a partir del análisis de muestras biológicas, emita un dictamen en el que determine:

- Si el Sr. Monsanto ha empleado los plaguicidas recientemente.
- Si el Sr. Monsanto empleó fármacos para alterar los resultados en el polígrafo.

Caso 2.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El Sr. Juan Cuesta trabaja en la fundición de baterías desde hace 5 años, recientemente ha presentado un cuadro clínico de un mes de evolución con dolor abdominal de moderada intensidad, asociado a sensación de mareo. Después de varias consultas externas con el médico familiar y de documentarse acerca de intoxicaciones laborales, Juan Cuesta relaciona este cuadro clínico con una intoxicación por plomo resultado de violaciones a la *NOM-010-STPS-199*, *SEMARNAT: NOM-052, NOM-053, NOM-054, NOM-055, NOM-056, NOM-057*,

NOM-058 en su lugar de trabajo, por lo que comienza a alertar a sus compañeros. Una semana después la compañía “Baterías Duramax S.A. de C.V.” lo despide argumentando el uso de sustancias de abuso en el lugar de trabajo. El Sr. Cuesta ha presentado una denuncia por despido injustificado. Se solicita la intervención de un toxicólogo forense para que, a partir del análisis de muestras biológicas, emita un dictamen en el que determine:

- Si el Sr. Cuesta ha empleado sustancias de abuso recientemente.
- Si el Sr. Cuesta presenta concentraciones plasmáticas de plomo que confirmen el diagnóstico clínico.

Caso 3.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Ricardo Carrillo Medina murió camino al hospital después de presentar síntomas como ansiedad, confusión mental, calambres, dolores musculares, dolor abdominal, vómito, diarrea y convulsiones. El médico forense dictamina que la muerte se presentó como resultado de una falla cardiorespiratoria, encontrando edema pulmonar de origen no cardiogénico. Se sospecha por tanto de una intoxicación por plaguicidas. Su esposa reporta que los síntomas se presentaron después de regresar de comer con su compadre, a quien le debía una cantidad considerable de dinero y quien es dueño de algunos cultivos vegetales. En el cateo de la casa del compadre se encontraron los siguientes plaguicidas: malatión, maloxón y metomilo. Además, en el área de la cocina se encontró un blíster vacío de tabletas cuya leyenda no permite distinguir el medicamento del que se trata. Se solicita la intervención de un toxicólogo forense para que, a partir de muestras biológicas, emita un dictamen en el que determine:

- Si se encuentra algún xenobiótico (medicamento o plaguicida) presente en el cuerpo.
- Si la cantidad de xenobiótico es suficiente para producir la muerte.

Caso 4.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El Sr. Humberto Abades de 33 años, con antecedentes médicos de consumo de cocaína, se encontraba en su departamento junto con su compañero de cuarto Alfonso Flores de 32 años. Alfonso Flores relata que el Sr. Abades ingresó al sanitario de la vivienda y minutos después escuchó ruidos de cosas cayendo, al preguntar si todo se encontraba en orden y no obtener respuesta alguna, ingresó al sanitario donde encontró al Sr. Abades recostado en posición decúbito ventral a un costado del inodoro. El Sr. Flores indica que sacó al Sr. Abades del sanitario y lo recostó en la cama en posición decúbito supino. Al percatarse de su dificultad para respirar, llamó al servicio médico de urgencias quienes al arribar 20 minutos después al lugar de la investigación encontraron al Sr. Abades sin vida.

El reporte médico externo indica haber encontrado un masculino adulto, tatuado, con bajo peso, con importante eritema en la mucosa nasal, sin datos de traumatismo y con hipertermia de 40 °C.

El examen interno resultado de la necropsia realizada por el médico forense reveló hallazgos como perforación del tabique nasal, edema, congestión y hemorragia pulmonar, congestión visceral, petequias en pleura, y alteraciones por aterosclerosis coronaria y aórtica grado I A.

Dado lo anterior, el Ministerio Público solicita la intervención de un toxicólogo forense para que, a partir de muestras biológicas, emita un dictamen en el que determine:

- Si se encuentra algún xenobiótico presente en el cuerpo del Sr. Abades.
- Si la cantidad de xenobiótico es suficiente para producir la muerte.

NOTA: Puede emplearse algún otro problema cerrado según la decisión del docente, siempre y cuando cumpla con los requerimientos para su solución en un plazo no mayor al asignado a la materia y sólo si los objetivos son claros para los alumnos.

Referencias Bibliográficas.

- [1] J. Núñez J., “Lo que la Educación Científica no Debería Olvidar: Rigor, Objetividad y Responsabilidad Social,” *La ciencia y la tecnología como procesos sociales. Lo que la educación científica no debería olvidar.*, 2000. .
- [2] A. Lancelle, “La Investigación Dirigida como Estrategia Didáctica en la Formación de Profesores de Biología,” *Rev. Estud. en Ciencias Humanas. Estud. y Monogr. los Postgrados.*, no. 9, pp. 1–11, 2010.
- [3] J. Martínez Torregrosa, J. L. Domènech Blanco, A. Menargues, and G. Romo Guadarrama, “La integración de los trabajos prácticos en la enseñanza de la química como investigación dirigida,” *Educ. Quim.*, vol. 23, no. 1, pp. 112–126, 2012.
- [4] M. I. Torres S., “La Enseñanza Tradicional de las Ciencias Versus las Nuevas Tendencias Educativas,” *Rev. Electrónica Educ.*, vol. XIV, no. 1, pp. 131–142, 2010.
- [5] J. I. Pozo and C. Monereo, *El Aprendizaje Estratégico. Enseñar a Aprender Desde el Currículo*. Madrid, España: Santillana/Aula XXI, 1999.
- [6] E. Morin, *Los siete Saberes Necesarios para la Educación del Futuro*. Barcelona, España: Editorial Paidós, 2001.
- [7] J. M. Miyahira A., “La investigación formativa y la formación para la investigación en el pregrado,” *Rev. Médica Hered.*, vol. 20, no. 3, pp. 119–122, 2009.
- [8] A. Villa and M. Poblete, *Aprendizaje Basado En Competencias. Una propuesta para la evaluación de las competencias genéricas*. Bilbao, Universidad de Deusto: Ediciones Mensajero, S. A. U., 2007.
- [9] J. Pozo and M. Gómez, *Aprender y enseñar ciencia: Del conocimiento cotidiano al conocimiento científico*. Madrid, España: Ediciones Morata, 1998.
- [10] C. Alfonso, “Familiarización de los estudiantes con la actividad científica investigadora: Método dinámico para caracterizar el movimiento de traslación de un cuerpo,” *Enseñanza las Ciencias*, vol. 3, no. 1, pp. 1–13, 2004.
- [11] O. Zarza C., “Aprendizaje por descubrimiento,” *Innovación y Exp. Educ.*, vol.

45, no. 6, pp. 1–10, 2009.

- [12] A. Garritz, “Indagación: las habilidades para desarrollarla y promover el aprendizaje,” *Educ. Quim.*, vol. 21, no. 2, pp. 190–197, 2010.
- [13] G. Gellon, E. Rosenvasser Feher, M. Furman, and D. Golomberck, *La Ciencia en el Aula. Lo que nos Dice la Ciencia de Cómo Enseñarla*. Paidós. Buenos Aires, 2005.
- [14] F. J. Diego-Rasill, *El método científico como recurso pedagógico en el bachillerato: Haciendo ciencia en clase de biología*. Pulso, 2004.
- [15] O. F. Ruíz, “Modelos didácticos para la enseñanza de las ciencias naturales,” *Rev. Latinoam. Estud. Educ.*, vol. 3, no. 2, pp. 41–60, 2007.
- [16] D. Gil, J. Martínez T., and B. Martínez S., “La Universidad como nivel privilegiado para un aprendizaje como investigación orientada,” in *La Universidad Ante la Nueva Cultura Educativa: Enseñar y Aprender para la Autonomía*, no. April, C. Monero and J. I. Pozo, Eds. 2003, pp. 231–244.
- [17] A. Mora Z., “La investigación dirigida,” *VII Congreso Nacional de Ciencias. Exploraciones Fuera y Dentro del Aula*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica, pp. 1–12, 2005.
- [18] M. Míguez, “Una Estrategia Didáctica Alternativa en Aulas Universitarias de Química: Potenciando el Proceso Motivacional por el Aprendizaje,” *Educ. Química*, vol. 21, no. 4, pp. 278–286, 2010.
- [19] M. de la C. Medina R., “Una Propuesta de Enseñanza Basada en la Investigación Dirigida del Tema de Transmisión de Calor para Estudiantes de Bachillerato,” Instituto Politécnico Nacional, 2011.
- [20] U. N. I. Drug, “Recommended Methods for the Detection and Assay of Lysergide (LSD), Phencyclidine (PCP), Psilocybin and Methaqualone in Biological Specimens,” p. 60, 1999.
- [21] L. Felipe and B. Estrada, “Acuerdo A/078/12 de la P.G.R. por el que se establecen la directrices que deberán observar los servidores públicos para la debida preservación y procesamiento del lugar de los hechos o del hallazgo y de los indicios, huellas o vestigios del hecho delictuo,” pp. 1–14, 2015.
- [22] I. de D. y R. Epidemiológica, *Manual para la Toma, Envío y Recepción de*

Muestras para Diagnóstico., PRIMERA ED. Ciudad de México: © INDRE-DGE-SECRETARÍA DE SALUD, 2014.

- [23] United Nations International Drug Control Programme, *Guidelines for Testing Drugs under International Control in Hair, Sweat and Saliva*. New York: United Nations, 2014.
- [24] M. J. N. Borge, "Tema 3. Secreción salivar y gástrica.," 2011. .
- [25] U. Departamento de Biología Celular y Tisular. Facultad de Medicina., "Repaso Teórico Biología Celular e Histología Médica 2ª Unidad Temática," p. 97, 2012.
- [26] L. Fondebrider and M. C. Mendonça, "Protocolo modelo para la investigación forense de muertes sospechosas de haberse producido por violación de los derechos humanos," p. 86, 2001.
- [27] U. N. I. D. C. Programme, "Guidelines for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts," p. 45, 2011.
- [28] United Nations International Drug Control Programme, *Recommended Methods for the Detection and Assay of Barbiturates and Benzodiazepines in Biological Specimens*. New York: United Nations, 1997.
- [29] D. J. S. Mejía, "¿Cómo se termina el efecto de los fármacos?" Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México, 2010.
- [30] B. et al. Levine, *Principles of Forensic Toxicology*, Third Edit. Whashington D.C: AACC Press, 2009.
- [31] A. E. Donaldson and I. L. Lamont, "Biochemistry Changes That Occur after Death: Potential Markers for Determining Post-Mortem Interval," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e82011, 2013.
- [32] A. Santos, D. Sen, I. Belda, A. Luis, G. Pozuelo, A. Alonso, C. Domingo, and M. Díaz, "Microbiología forense," *Reduca (Biología). Ser. Microbiol.*, vol. 5, no. 5, pp. 23–45, 2012.
- [33] Clarke, *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*, Second Edi. London: Pharmaceutical Press, 2013.
- [34] F. Gennesser, "Aparato digestivo," *Histología*, pp. 465–534, 2000.
- [35] E. V. Contreras, "Los ácidos biliares," *Instituto de Química. UNAM*, 2003. .

- [36] T. U. O. C. Medicine, "Hígado: Anatomía y Funciones," 2015. .
- [37] R. et al. Vanbinst, "Bile analysis of drugs in post-mortem cases," *Forensic Sci. Int.*, vol. 128, pp. 35–40, 2002.
- [38] a. Ortega Pérez, "¿Estaba intoxicado por cocaína este individuo? (I): estimaciones basadas en la farmacocinética de la droga," *Cuad. Med. Forense*, no. 33, pp. 5–12, 2003.
- [39] C. Pascuzzo, *Farmacología Básica*. 2008.
- [40] R. Getty, "Sistema Digestivo," *Anat. dos animais domésticos*, pp. 1–17, 1981.
- [41] J. Perea and J. Subirats, "La digestión," in *Biología. ESO*, Casals, 2005, p. 16.
- [42] J. Joseph Fenton, *Toxicology. A case-oriented approach*. New York: LLC, CRC Press, 2002.
- [43] J. T. Mosquera and M. C. Menéndez, "Alcohol etílico: Un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado," *Rev. Fac. Med. Univ. Nac. Colomb.*, vol. 54, pp. 32–47, 2006.
- [44] H. Cl, B. Envar, and B. Oliver, "Toxicología del cannabis," *Adicciones*, vol. 12, no. 2, pp. 169–174, 2000.
- [45] P. C. Favaro, *Metrology of Nail Clippings as Trace Element Biomarkers*. NETHERLANDS: IOS Press, 2013.
- [46] I. Rodushkin and M. D. Axelsson, "Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden," *Sci Total Env.*, vol. 262, no. 21, 2000.
- [47] S. Suzuki and T. Inoue, "Analysis of Methamphetamine in Hair, Nail, Sweat, and Saliva by Mass Fragmentography," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 13, pp. 176–178, 1989.
- [48] K. Arwa, M. Nadia, A. Adnene, H. Zouheir, and M. Samir, "Application of Victim's Fingernails in Forensic DNA Analysis," *J. Indian Acad. Forensic Med.*, vol. 32, no. 4, pp. 971–973, 2007.
- [49] a Fernández-Rodríguez, M. . Iturralde, L. Fernández de Simón, J. Capilla, and M. Sancho, "Genetic analysis of fingernail debris: application to forensic

- casework," *Int. Congr. Ser.*, vol. 1239, pp. 921–924, 2003.
- [50] E. M. a Ali, H. G. M. Edwards, M. D. Hargreaves, and I. J. Scowen, "Detection of explosives on human nail using confocal Raman microscopy," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 40, no. November 2008, pp. 144–149, 2009.
- [51] O. A. Locani, M. J. Ramírez, M. L. Santos, and A. Silva, *Toxicología Forense*, First Edit. Argentina: Dosyuna Ediciones Argentinas, 2009.
- [52] Committe of Systematic Toxicological Analysis, "Recommendations on Sample Collection," *Int. Assoc. Forensic Toxicol.*, vol. XXIX, no. 1, pp. 1–7, 2008.
- [53] PGR, *ACUERDO A/009/15 Por el que se establecen las directrices que deberán observar los servidores públicos que intervengan en materia de cadena de custodia*. México: Diario Oficial de la Federación, 2015, pp. 1–19.
- [54] Secretaría de Gobernación, Procuraduría General de la República, and Consejo de Coordinación para la Implementación del Sistema de Justicia Penal, "Guía Nacional de Cadena de Custodia." Conferencias Nacionales Conjuntas de Procuración de Justicia y de Secretarios de Seguridad Pública, México, p. 42, 2015.
- [55] E. D. Álvarez-Guerra, H. G. Parkes, and J. D. Bell, "Estudio comparado de dos métodos de desproteización para la evaluación de sangre total y plasma mediante espectroscopia de resonancia magnética," *Bioquímica*, vol. 31, no. 2, pp. 59–68, 2006.
- [56] A. R. Gennaro, *Remington. Farmacia. Volúmen 1.*, 20th ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A., 2003.
- [57] A. B. Pomilio and A. A. Vitale, "Técnicas para determinación cuali/cuantitativa de drogas de abuso en fluidos biológicos," *Acta bioquímica clínica Latinoam.*, vol. 40, no. 3, pp. 347–382, 2006.
- [58] Commite of Systematic Toxicological Analysis, "Recommendations on Sample Preparation of Biological Specimens for Systematic Toxicological Analysis," *Int. Assoc. Forensic Toxicol.*, vol. XLI, no. 2, pp. 1–10, 2012.
- [59] J. M. Macarulla and F. M. Goñi, *Bioquímica Humana: Curso Básico.*, Segunda Ed. Barcelona, España: Editorial Reverté, S.A., 1994.

- [60] T. Cairns, V. Hill, M. Schaffer, and W. Thistle, "Removing and Identifying Drug Contamination in the Analysis of Human Hair.," *Forensic Sci. Int.*, vol. 145, pp. 97–108, 2004.
- [61] L. Tsanaclis and J. F. Wicks, "Differentiation Between Drug Use and Environmental Contamination When Testing for Drug in Hair," *Forensic Sci. Int.*, vol. 176, pp. 19–22, 2008.
- [62] N. T. Lappas and C. M. Lappas, *Forensic Toxicology: Principles and Concepts*, First Edit. China: Shirley Decker-Lucke, 2016.
- [63] I. Papoutsis, P. Nikolaou, A. Dona, C. Pistos, M. Stefanidou, C. Spiliopoulou, and S. Athanaselis, "A validated GC–MS method for the determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in bile samples," *Forensic Toxicol.*, vol. 30, no. 1, pp. 51–58, 2012.
- [64] D. G. Barceloux, *Medical Toxicology of Drug Abuse: Synthesized Chemicals and Psychoactive Plants*. USA: Wiley, 2012.
- [65] Cheng and et al. Liang, "Identification and quantification of 34 drugs and toxic compounds in blood, urine, and gastric content using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Liquid Chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 30, no. 10, 2015.
- [66] UNAM, "Técnicas Cromatográficas," *Quim. Anal. Instrum. II*, pp. 1–123, 2007.
- [67] T. Michael, "Drugs Testing Book," *Basic Immunoassay Principles and Guidelines*, 2015. .
- [68] R. V Calderón, "Inmunoquímica," Cuernavaca, Morelos, 2007.
- [69] M. Repetto Jiménez and G. Repetto Kuhn, *Toxicología Fundamental*, Cuarta Edi. Sevilla, España: Diaz de Santos, 2009.
- [70] R. Ochoa, *Técnicas Inmunoenzimáticas Para Ensayos Clínicos de Vacunas y Estudios Inmunoepidemiológicos*, Primera Ed. La Habana, Cuba: Ediciones Finlay, 2012.
- [71] G. F. Biancucci and A. Strobl, *Manual de Procedimientos Aanalíticos Toxicológicos Para Laboratorios de Baja Complejidad*. Argentina, 2007.
- [72] J. L. S. Martínez, "Instrumentacion y métodos de análisis quimico, epectroscopia infrarroja I. Fundamentos.," 2009.

- [73] L. C. Espinoza, "Utilización de espectroscopia infrarroja FTIR para la detección de microorganismos," pp. 1–8, 2010.
- [74] U. de Alicante, "Servicios Técnicos de Investigación," *ESPECTROSCOPIA INFRARROJA. Fundamentos*, 2015. .
- [75] E. González Tepalte, "Desarrollo de una Práctica Instrumental Integral. Análisis de Isoniazida por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia, Espectroscopía UV-Visible y Espectroscopía Infrarroja," UNAM, 2013.
- [76] V. D. González Martínez, "Validación de un método espectrofotométrico de UV/VIS para determinar ácido benzoico en bebidas de frutas," UNAM, 1999.
- [77] M. J. Tabernero Duque and A. M. Bermejo Barrera, "Interpretación de resultados en la investigación toxicológica de drogas de abuso.," *Boletín Galego Med. Leg. e Forense*, no. 16, pp. 45–55, 2009.
- [78] L. P. Olgún, H. Magadán, and M. Rodríguez, "Métodos en Biotecnología. Cromatografía de Gases.," *Inst. Biotecnol.*, pp. 3–45, 2004.
- [79] E. Arribas Arbiol and F. Bandrés Moya, *Toxicología Clínica y Drogodependencias: Metadona*, Primera Ed. Madrid, España: Fundación Tejerina, Unidad Docente, 2009.
- [80] D. A. Skoog, F. J. Holler, and D. M. West, *Fundamentos de Química Analítica*, Cuarta Ed. Barcelona: Editorial Reverté, S.A., 2001.
- [81] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principios de Análisis Instrumental*, Sexta Edic. México: Editorial Cengage Learning, 2008.
- [82] E. Rocha Castro, "Espectrometría de absorción atómica," *Fac. ciencias Quim.*, pp. 123–203, 2000.
- [83] M. I. Sánchez de Rojas, M. Pilar de Luxan, and M. Frias, "Inductively coupled plasma emission spectrometry," *Mater. Construcción*, vol. 36, no. 202, pp. 31–46, 1986.
- [84] R. Arvizu, E. Valle, and A. Reyes, "Implementación del Método de Dilución Isotópica de Dos Etapas En La Medición de Cadmio y zinc en Tejido de Molusco," *Simposio de Metrología*, no. 2. Querétaro, México, pp. 1–10, 2006.
- [85] R. García-Repetto, "Interpretación de resultados toxicológicos post-mórtem: criterios de garantía de calidad," *Rev. Española Med. Leg.*, vol. 41, no. 1, pp.

9–18, 2015.

- [86] F. Musshoff, U. M. Stamer, and B. Madea, “Pharmacogenetics and forensic toxicology,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 203, no. 1–3, pp. 53–62, 2010.
- [87] P. Alicot, A. Laure, and et al., “Mechanisms Underlying Postmortem Redistribution of Drugs: a review,” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 27, pp. 533–544, 2003.
- [88] B. K. Logan and D. Smirnow, “Postmortem distribution and redistribution of morphine in man,” *J Forensic Sci*, vol. 41, no. 2, pp. 221–229, 1996.
- [89] G. R. Jones and D. J. Pounder, “Site dependence of drug concentrations in postmortem blood—a case study,” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 11, no. 5, pp. 186–190, 1987.
- [90] R. W. Prouty and W. H. Anderson, “A comparison of postmortem heart blood and femoral blood ethyl alcohol concentrations,” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 11, no. 5, pp. 191–197, 1987.
- [91] V. M. Hargrove and J. R. McCutcheon, “Comparison of drug concentrations taken from clamped and unclamped femoral vessels.,” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 32, no. 8, pp. 621–625, 2008.
- [92] M. Repetto and P. Sanz, *Glosario de Términos Toxicológicos. Recomendaciones de la IUPAC-1993. Versión Española Ampliada*. España, 1995.
- [93] R. Chang, *Química*, Décima Edi. Editorial McGraw-Hill, 2007.
- [94] R. A. Española, *Diccionario de la Lengua Española*, Vigésima E. España: Real Academia Española, 2014.

Anexos.

Anexo 1. Índice de figuras.

Figura 1. Representación esquemática del proceso de absorción, distribución, metabolismo y eliminación.	73
Figura 2. Intervalo de tiempo transcurrido desde la exposición para el análisis útil de una muestra biológica.	92
Figura 3. Formato de etiquetas para embalaje de indicios. Anexo 5 del Acuerdo A/009/15[51]	124
Figura 4. Cromatograma comparativo entre una muestra desconocida y un patrón o testigo en donde se muestra el cálculo de Rf para muestra y testigo.	169
Figura 5. Esquema del mecanismo de acción de cerraduras.	171
Figura 6. Esquema de una reacción inmunoenzimática tipo EIA.	172
Figura 7. Representación esquemática de los inmunoensayos EMIT.	174
Figura 8. Representación esquemática de los inmunoensayos CEDIA.	175
Figura 9. Esquema de una reacción ELISA Indirecta.	176
Figura 10. Espectro IR de Ácido Barbitúrico con bromuro de potasio (KBr) como blanco a través de ATR.	198
Figura 11. Esquema de un cromatograma.	205
Figura 12. Estructura simplificada de un cromatógrafo de gases.	207
Figura 13. Esquema de un detector tipo TCD.	208
Figura 14. Esquema de un detector tipo FID.	209
Figura 15. Esquema de un detector tipo NPD.	210
Figura 16. Esquema de un detector tipo ECD.	211
Figura 17. Curva de calibración por patrón interno.	219
Figura 18. Esquema de los componentes de un sistema HPLC.	225
Figura 19. Clasificación de los métodos espectroscópicos.	229
Figura 20. Esquema de un Espectrómetro de Masas.	232
Figura 21. Espectro de masas de malatión.	236
Figura 22. Espectro de absorción atómica del sodio (a). Transiciones electrónicas del sodio que generan el espectro de absorción atómica (b).	239

Figura 23. Esquema de un Espectrómetro Atómico de Absorción en flama.	241
Figura 24. Esquema de un Espectrómetro Atómico de Emisión ICP.	248
Figura 25. Comparación de espectros entre la técnica de ICP e ICP-MS.	252
Figura 26. Curvas de calibración para berilio, cromo, cadmio, cinc y plomo.	254
Figura 27. Rombo de comunicación de riesgos.	296

Anexo 2. Índice de tablas.

Tabla 1. Competencias y subcompetencias para la materia de toxicología.	55
Tabla 2. <i>Períodos de tiempo de vida media ($t_{1/2}$), para algunas benzodiazepinas (United Nations International Drug Control Programme, 2014 [25]).</i>	82
Tabla 3. <i>Metabolitos, tiempo de vida media e información de la excreción de diferentes sustancias de abuso (United Nations International Drug Control Programme, 1997 [26]).</i>	86
Tabla 4. <i>Datos comparativos entre sangre, orina y cabello.</i>	91
Tabla 5. <i>Solvente extractante, grupo extraído y porcentaje de recobro de algunas sustancias de abuso (United Nations International Drug Control Programme, 1997 [26]).</i>	146
Tabla 6. <i>Comparación de límites de corte para la serie analítica entre sangre y saliva (United Nations International Drug Control Programme, 2014 [21]).</i>	156
Tabla 7. <i>Ensayo o reactivo a emplear según el grupo funcional.</i>	179
Tabla 8. <i>Datos obtenidos para la curva de calibración para el analito A.</i>	218
Tabla 9. <i>Valores de concentración para el analito A empleando el primer método de cálculo.</i>	220
Tabla 10. <i>Tipos de Cromatografía Líquida.</i>	222
Tabla 11. <i>Componentes y variantes de un Espectrómetro de Masas.</i>	234
Tabla 12. <i>Tipos de atomizadores en un Espectrómetro Atómico de Absorción.</i> ...	242
Tabla 13. <i>Tipos de nebulizadores en un Espectrómetro Atómico de Absorción.</i> ...	242
Tabla 14. <i>Longitudes de onda características para algunos metales.</i>	251
Tabla 15. <i>Condiciones preanalíticas a considerar.</i>	259
Tabla 16. <i>Factores relacionados con las propiedades de los analitos que influyen en la interpretación de resultados</i>	262
Tabla 17. <i>Factores interindividuales que influyen en la interpretación de resultados.</i>	264
Tabla 18. <i>Situaciones en las cuales la genotipificación puede proporcionar información adicional. Traducida de Musshoff, F. et al. 2010[83].</i>	266

Tabla 19. Sustancias que presentan distribución postmortem	267
<i>Tabla 20. Sustancias Para Lavado.....</i>	<i>294</i>
<i>Tabla 21. Letras De Identificación Para El Equipo De Protección Personal.....</i>	<i>296</i>

Anexo 3. Reporte de seguridad e higiene A.

Laboratorio de Toxicología

Fecha:	Equipo:	Responsable:
Sesión/Actividades:		
Integrantes:		

Reporte de utilización de reactivos

Reactivo	Cantidad preparada/Iniciales	Cantidad empleada (por equipo)	Observaciones anormales (contaminado, más de una fase, coloración anormal, precipitados)

Reporte de vigilancia de equipo

Equipo	Hora de inicio de uso/ término	Condiciones de uso (Cantidad pesada ¹ , longitud de onda ² , rpm ³ , tiempo ⁴ , temperatura ⁵ , disolvente utilizado ⁶ , aumento ⁷ , volumen ⁸)	Observaciones (Sucio, no funciona adecuadamente, sin observaciones, <u>anotar el número de equipo o inventario cuando considere que requiere mantenimiento</u>)
Balanza¹			
Espectrofotómetro²			
Centrífuga^{3,4}			
Microcentrífuga^{3,4}			
Estufa^{4,5}			
Rotaevaporador^{5,6}			
Microscopio⁷			
Lámpara de luz UV²			
Incubadora^{4,5}			
OTRO			

Reporte de disposición de residuos

Residuo (R)	Observaciones (contenido, estado físico, si hay más de una fase o tiene precipitado)	CRETIB⁺
		C R E T I B
		C R E T I B
		C R E T I B
		C R E T I B
		C R E T I B

*** Marque con una X, la(s) letra(s) correspondiente de acuerdo al sistema *CRETIB* (Corrosivo, Reactivo, Explosivo, Tóxico, Inflamable, Biológico-Infecioso)**

(Nombre y firma del encargado de seguridad)

Símbolo Universal Del Residuo Biológico.



Etiquetas De Residuos Biológicos.

 UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

RESIDUO BIOLÓGICO

() LÍQUIDO: _____
() SÓLIDO: _____

DEPARTAMENTO: _____
LABORATORIO: _____
RESPONSABLE: _____
FECHA: _____

CARACTERÍSTICA:

- SANGRE ()
- CEPAS Y CULTIVOS ()
- PATOLÓGICOS ()
- NO ANATÓMICOS ()

**Comisión de
Bioseguridad**

Etiquetas De Residuos Punzocortante.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA




RESIDUO PUNZOCORTANTE

SÓLIDO: _____
DEPARTAMENTO: _____
LABORATORIO: _____
RESPONSABLE: _____
FECHA: _____

**Comisión de
Biosseguridad**

Etiquetas De Residuos Químicos.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**
FACULTAD DE MEDICINA

RESIDUO QUÍMICO

() LÍQUIDO: _____
() SÓLIDO: _____
DEPARTAMENTO: _____
LABORATORIO: _____
RESPONSABLE: _____
FECHA: _____

CARACTERÍSTICA:
➤ CORROSIVO ()
➤ REACTIVO ()
➤ EXPLOSIVO ()
➤ TÓXICO ()
➤ INFLAMABLE ()

**Comisión de
Biosseguridad**



RESIDUOS PUNZO-CORTANTES, BIOLÓGICO INFECCIOSOS
FACULTAD DE MEDICINA



FM/CB/001/09

Departamento: _____ Fecha: _____
Laboratorio: _____ Responsable: _____

TIPO DE RESIDUO ¹	DESCRIPCIÓN ²	CANTIDAD ³ (K, G)	TIPO DE ENVASE ⁴

¹ Residuo: AGUJAS, HOJAS DE BISTURÍ

² Descripción: Señalar tipo de contenedor, condiciones del mismo; etc. Toda la información posible.

³ Peso aproximado.

⁴ Tipo de envase: Señalar si es vidrio, plástico, lata, caja, bolsa, etc.

Solicitudes Para Ala Disposición Y Tratamiento De Materiales Y Residuos Biológico
Infecciosos.

FM/CB/001/09



**INVENTARIO DE RESIDUOS QUIMICOS EXISTENTES
FACULTAD DE MEDICINA**



Departamento: _____

Fecha: _____

Laboratorio: _____

Responsable: _____

Tipo de residuo ¹	Composición (%, concentración, medio de disolución, etc.)	Cantidad ² (L, g)	Tipo de envase ³

¹ Residuo: No corresponde a reactivos en uso ni a los almacenados.

² Cantidad: Especificar volumen ó peso aproximado.

³ Tipo de envase: Señalar si es vidrio, plástico, lata, caja, bolsa, etc.

Anexo 4. Procedimiento para el lavado de frascos de vidrio

Usualmente los frascos de vidrio que contuvieron reactivos o residuos químicos quedan impregnados con pequeños remanentes de material, dichos frascos requieren de un lavado previo a ser, ya sea desechado o rehusado.

Este procedimiento tiene como objetivo principal establecer los principales pasos para la limpieza de frascos de vidrio que contuvieron reactivos y residuos químicos.

1. Usar el equipo de protección personal que comúnmente utiliza para preparar sus reactivos (bata, guantes, lentes de seguridad).
2. Escurrir todo el contenido del frasco y depositarlo en los residuos químicos de su laboratorio.
3. Realizar un primer lavado del frasco de acuerdo a la siguiente recomendación:

Tabla 20. Sustancias Para Lavado.

Solución*	Contenido	Remanentes de
A	Carbonato de sodio 5% Tiosulfato de sodio 5%	Ácidos inorgánicos, cloroformo, disolventes aromáticos
B	Hipoclorito de calcio 10%	Metales pesados, fenoles, cianuros, amoniaco
C	Tiosulfato de sodio 5%	Aceites, grasas, disolventes halogenados
D	Ácido clorhídrico 5%	Bases inorgánicas, álcalis
E	Detergente en agua	Hidrocarburos, disolventes oxigenados, sales inorgánicas de sodio, potasio, cobre, magnesio, etc.

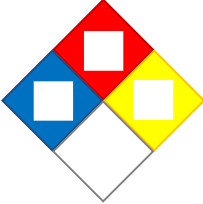
* Estas soluciones se recomiendan en la literatura principalmente aplicando el factor de dilución y en algunos casos la degradación química.

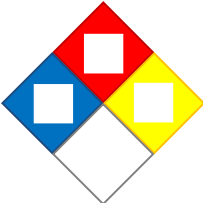
4. Los residuos del primer lavado deberán separarse en un frasco de residuos rotulado como "RESIDUOS DE LAVADO DE VIDRIO".
5. Dar un segundo lavado con la solución E y desechar al drenaje.
6. Finalizar con un tercer lavado con abundante agua.

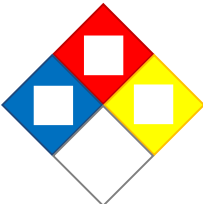
Si el frasco se va a desechar a la basura como residuos inorgánicos deberán romperse para evitar su reúso.

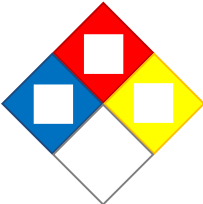
Anexo 5. Hoja de seguridad de reactivos.

Investigue los siguientes datos (MSDS, Merck Index) y complete las siguientes tablas para cada sustancia a emplear. Posteriormente, en el “Rombo de comunicación de riesgos”, indique el valor de 0 a 4, correspondiente a cada riesgo (Salud, Inflamabilidad, Reactividad y Características específicas) de acuerdo a la **Clasificación y grados de riesgo de las sustancias peligrosas (ANEXO 1 DEL REPORTE DE SEGURIDAD E HIGIENE)**.

Reactivo:		
DL ₅₀ /CL ₅₀ (rata):		
Punto de ignición:		
Reactividad / Incompatibilidad:		
Características específicas:		
Equipo de protección personal:		

Reactivo:		
DL ₅₀ /CL ₅₀ (rata):		
Punto de ignición:		
Reactividad / Incompatibilidad:		
Características específicas:		
Equipo de protección personal:		

Reactivo:		
DL ₅₀ /CL ₅₀ (rata):		
Punto de ignición:		
Reactividad / Incompatibilidad:		
Características específicas:		
Equipo de protección personal:		

Reactivo:		
DL ₅₀ /CL ₅₀ (rata):		
Punto de ignición:		
Reactividad / Incompatibilidad:		
Características específicas:		
Equipo de protección personal:		

En “Equipo de protección personal” indique la(s) letra(s) de identificación correspondiente(s) con base en la tabla del ANEXO 6.

**Anexo 6. Reporte de seguridad e higiene B.
CLASIFICACIÓN Y GRADOS DE RIESGO DE LAS SUSTANCIA QUÍMICAS**

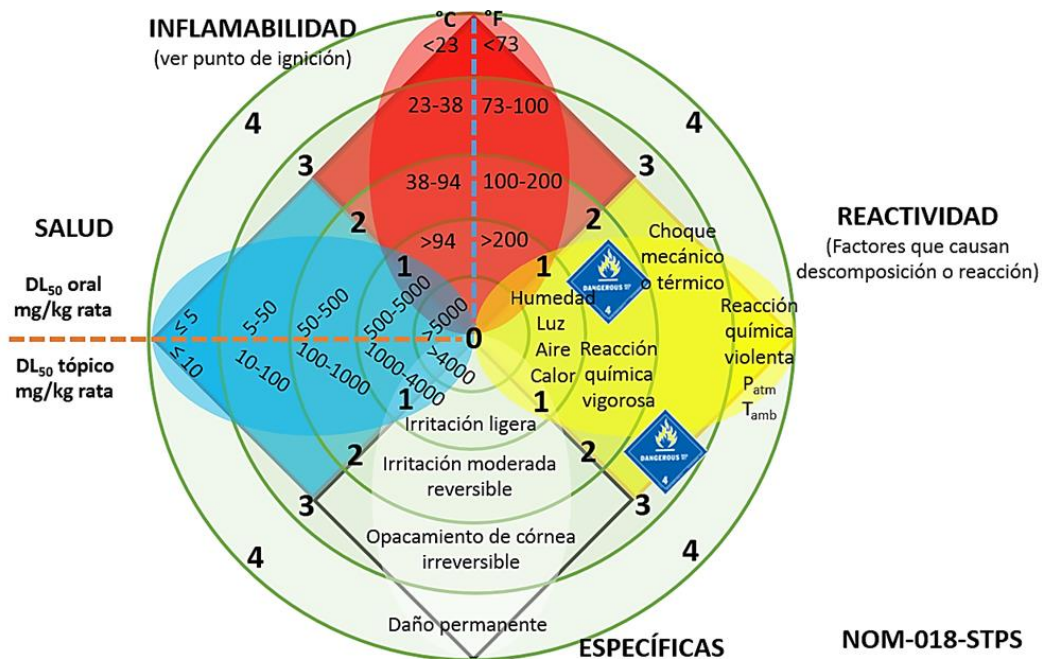


Figura 27. Rombo de comunicación de riesgos.

Tabla 21. Letras De Identificación Para El Equipo De Protección Personal.

Letra	Equipo de protección personal
A	Anteojos de seguridad
B	Anteojos de seguridad y guantes
C	Anteojos de seguridad, guantes y mandil
D	Careta, guantes y mandil
E	Anteojos de seguridad, guantes y respirador para polvos
F	Anteojos de seguridad, guantes, mandil y respirador para vapores
G	Anteojos de seguridad, guantes y respirador para vapores
H	Gafas de seguridad para salpicaduras, guantes, mandil y respirador para vapores
I	Anteojos de seguridad, guantes y respirador para polvos y vapores
J	Gafas de seguridad para salpicaduras, guantes, mandil y respirador para polvos y vapores
K	Capucha con línea de aire o equipo SCBA, guantes, traje completo de protección y botas
X	Consulte con el supervisor las indicaciones especiales para el manejo de estas sustancias

Anexo 7. Rúbrica para evaluación de Dictamen.

<i>Elemento</i>	Descriptor			
	Excelente (5 ó 6 puntos)	Bueno (3 ó 4 puntos)	Regular (1 ó 2 puntos)	Malo (0 puntos)
1. Formato	<p>Coloca el logotipo de la institución donde realizó el estudio en la esquina superior izquierda en las dimensiones adecuadas (recomendado 5 x 5 cm) sólo en la primera hoja.</p> <p>Las hojas está numeradas e incluyen pie con referencia al número de averiguación previa (carpeta de investigación) y fecha de emisión.</p> <p>Emplea una fuente apropiada (Recomendada: Arial o Times New Roman, 10 a 12 puntos), justificado (párrafo a espacio y medio o doble).</p> <p>Respeta los márgenes de la hoja. Todos los elementos son identificables por un formato distintivo (en mayúsculas en negritas o subrayado o numerado, excepto rubro y exordio o proemio).</p>	<p>No cumple con 1 ó 2 de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con 3 ó 4 de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>

<p>2. Rubro</p>	<p>Se encuentra en la esquina superior derecha de la primera hoja.</p> <p>Contiene: número de averiguación previa (carpeta de investigación) o causa penal, número de oficio del solicitante, fecha de solicitud, lugar y fecha de emisión, y asunto indicando la especialidad forense (se rinde dictamen/reporte técnico en materia de "<u>Toxicología</u>").</p>	<p>No cumple con una de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con dos de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>
<p>3. Exordio o proemio</p>	<p>Indica a la persona a quien va dirigida el documento, puesto e institución.</p> <p>PRESENTE</p> <p>Realiza la presentación de (los) experto(s) que realizó (aron) el dictamen o reporte técnico, nombramiento, con cédula profesional e institución que la expidió, designación, relación con el rubro e indica la emisión de un dictamen o reporte técnico indicando la especialidad forense, ligando el proemio al planteamiento del problema.</p>	<p>No cumple con una de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con dos de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>

<p>4. Planteamiento del problema</p>	<p>Escribe el objetivo general del estudio y/o enumera TODOS los objetivos particulares del estudio realizado (esta numeración debe coincidir con las conclusiones) a partir de la solicitud de la autoridad correspondiente.</p> <p>En su caso, plantea la pregunta que realizó la autoridad correspondiente y establece TODOS los objetivos particulares a cumplir para responderla.</p> <p>La redacción de los objetivos empieza con un verbo infinitivo que claramente indica las acciones a realizar sobre el material de estudio para cumplir cada objetivo particular.</p>	<p>Escribe el objetivo general del estudio y/o enumera CASI TODOS los objetivos particulares del estudio realizado (respetando la redacción y numeración de los objetivos).</p> <p>Plantea la pregunta que realizó la autoridad y establece CASI TODOS los objetivos a cumplir para responderla.</p>	<p>Únicamente escribe el planteamiento general o pregunta</p> <p>O</p> <p>Enumera algunos objetivos</p> <p>O</p> <p>Escribe los objetivos particulares a modo de preguntas o de manera muy diferente a lo establecido.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>
<p>5. Material de estudio</p>	<p>Describe extensamente cada material (estado, características, tipo de embalaje), de ser posible, incluye su fotografía en un anexo (debe haber concordancia en la numeración en el dictamen y en el anexo). La descripción de cada indicio incluye el número de indicio respetando el registro de cadena de custodia, así como su fecha de recepción.</p>	<p>No cumple con una de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con dos de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>

<p>6. Método</p>	<p>Menciona el (los) método(s) que realmente empleó, describiendo el fundamento de cada uno y cómo se aplican en este estudio. Ejemplo: método analítico.</p>	<p>Menciona el (los) método(s) que realmente empleó, describiendo el fundamento de cada uno.</p>	<p>Menciona el (los) método(s) que empleó sin incluir los que no empleó.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>
<p>7. Técnicas empleadas</p>	<p>Para el estudios de cada material: Enlista todas las técnicas empleadas, indicando si es una técnica modificada y número de repeticiones. Indica los equipos empleados (marca, modelo y otras características relevantes como software asociado, anexos o complementos). Indica los reactivos empleados (proveedor y en caso de haberlo preparado: concentración y fecha de preparación). En su caso, indica el software empleado y versión (se sugiere una relación en formato de tabla). En su caso, indica los materiales empleados (lupas, lámparas, etc) y sus características.</p>	<p>No cumple con una de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con dos de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>

<p>8. Consideraciones técnico-científicas (si aplica)</p>	<p>Describe detalladamente por qué no es posible realizar los estudios pertinentes, basándose en fundamentos científicos y comentado sobre qué tan adecuados son los indicios proporcionados o las técnicas para responder a los cuestionamientos de la autoridad correspondiente.</p> <p>Las consideraciones son críticas y fundamentadas, exponen la información que sí se puede obtener y la información que no.</p>	<p>Menciona las razones por las que no es posible realizar el estudio, basándose en fundamentos científicos y comentando brevemente sobre la calidad de los indicios y/o alcances de las técnicas.</p>	<p>Menciona las razones por las que no se puede realizar el estudio y comenta la calidad de los indicios.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>
<p>9. Marco teórico</p>	<p>Describe el fundamento de cada una de las pruebas realizadas, explicando cómo se interpretan y comentando su posible margen de error (falsos positivos y negativos, etc.).</p>	<p>Describe el fundamento de cada una de las pruebas realizadas, explicando cómo se interpretan.</p>	<p>Describe el fundamento de cada una de las pruebas realizadas.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>
<p>10. Resultados</p>	<p>Para cada material de estudio presenta los resultados cualitativos y/o cuantitativos correspondientes a cada una de las técnicas empleadas, en caso de tener resultados gráficos o fotográficos, los describe e incluye en un anexo (debe haber concordancia en la numeración). Los resultados se expresan en</p>	<p>No cumple con una de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con dos de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>

	<p>las unidades correctas. Los resultados se presentan a forma de promedio e indican su desviación estándar. Indica el número de indicio y fecha de estudio.</p>			
<p>11. Análisis de resultados</p>	<p>Para cada material de estudio, realiza una interpretación OBJETIVA de los resultados, basándose en los fundamentos de las técnicas empleadas.</p> <p>Comenta sobre la calidad de sus resultados (repetibilidad, margen de error, etc.). Únicamente comenta sobre los resultados, nunca sobre sus implicaciones (no menciona que se ha cometido un delito ni describe acciones).</p>	<p>No cumple con una de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con dos de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>
<p>12. Conclusiones</p>	<p>Escribe un párrafo introductorio a las conclusiones resumiendo las actuaciones realizadas.</p> <p>Enumera cada una de las conclusiones de acuerdo a la numeración del planteamiento del problema.</p> <p>Cada conclusión se escribe a modo de respuesta y es concreta.</p>	<p>No cumple con una de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con dos de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>

<p>13. Firmas</p>	<p>Indica la palabra “Atentamente” seguido de nombre completo, firma (en tinta), especialidad forense, fecha de emisión, número total de páginas (incluyendo anexos).</p>	<p>No cumple con una de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con dos de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>
<p>14. Referencias consultadas</p>	<p>Incluye material consulta básico (libros de texto por ejemplo), artículos, boletines, documentos oficiales, protocolos y todos aquellos documentos pertinentes para sustentar su marco teórico y las técnicas.</p> <p>En general las referencias son actuales y confiables.</p> <p>Las referencias están citadas en el cuerpo del dictamen y tienen coherencia con la lista bibliográfica.</p> <p>Las referencias se presentan en un estilo estándar (Se recomienda APA, Harvard o el Journal of Forensic Sciences).</p>	<p>No cumple con una de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con dos de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>

15. Anexos (cuando existen resultados gráficos)

<p>Los anexos se numeran consecutivamente e indican el tipo de anexo del que se trata (fotográfico, gráfico, croquis o plano, etc.).</p> <p>Cada elemento del anexo tiene un número concordante con lo indicado en el texto y pie de figura que lo describe.</p> <p>Las imágenes que no son de la autoría del experto que realiza el dictamen, deben dar crédito al autor.</p> <p>Se incluye un índice de elementos de cada anexo.</p>	<p>No cumple con una de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con dos de las características mencionadas en el descriptor superior.</p>	<p>No cumple con ninguno de los descriptores mencionados o no está presente.</p>
--	--	--	--

Anexo 8. Rúbrica para evaluación de Bitácora de Laboratorio.

	Puntaje 0	1	2	3	4	Total
<i>Es un cuaderno destinado para uso exclusivo de la asignatura</i>	No es exclusivo	Es exclusivo				1
<i>La encuadernación es permanente (cosido)</i>	No es permanente	Es permanente				1
<i>El contenido de la portada está completo: (Nombre del alumno, nombre de la asignatura, tabla de contenidos)</i>	No tiene portada	La portada contiene al menos uno de los elementos	La portada contiene dos de los elementos	La portada contiene tres de los elementos	La portada contiene los tres elementos y la tabla de contenido tiene el paginado	4
<i>Las hojas están foliadas</i>	No están foliadas	Están foliadas	Están foliadas en la esquina superior derecha			2
<i>Escritura</i>	Está escrita en lápiz	Está escrita en tinta con empleo de corrector	Está escrita en tinta sin empleo de corrector	Está escrita en tinta azul sin empleo de corrector		3
	Están borradas empleando corrector, o con	Están	Están tachadas			2

<i>Correcciones</i>	tachaduras que hacen ilegible la anotación inicial o sobreponiendo datos	tachadas con una línea	con una línea, firmadas y fechadas			
<i>Las actividades están fechadas</i>	No están fechadas	Sí están fechadas				1
<i>Gráficas o figuras</i>	No Están en el contenido de la bitácora	Están pegadas en la bitácora	Están pegadas y firmadas abarcando la hoja en donde se pega la gráfica	Están pegadas y firmadas abarcando la hoja en donde se pega la gráfica y protegidas con cinta adhesiva		3
<i>Hojas en blanco</i>	Tiene hojas en blanco	No tiene hojas en blanco	No tiene ni hojas ni espacios en blanco			2
Contenido						
<i>Título de la práctica</i>	No tiene título de la práctica o sesión	Tiene título de la práctica o sesión				1
<i>Objetivos de la práctica</i>	No tiene el objetivo de la práctica o sesión	Tiene el objetivo de la práctica o sesión				1

<i>Materiales, equipos y reactivos o sistemas biológicos a utilizar</i>	No presenta estos elementos	Presenta parte de los elementos	Presenta todos los elementos			2
<i>Información de seguridad de reactivos (toxicidad, inflamabilidad o incompatibilidad con otros reactivos, características de la cepa, etc.)</i>	No presenta la información de seguridad	Presenta menos del 50% de la información solicitada	Presenta el 50% o más de la información solicitada	Presenta toda la información solicitada		3
<i>Cálculos para la preparación de disoluciones</i>	No presenta los cálculos	Presenta los cálculos	Presenta los cálculos ordenados			2
<i>Conocimientos previos</i>	No presenta los conocimientos previos	Presenta menos del 50% de la información solicitada	Presenta el 50% o más de la información solicitada	Presenta toda la información solicitada		3
<i>Reacciones químicas</i>	No las presenta	Las presenta	Las presenta y están balanceadas			2
<i>Procedimientos realizados y/o diagrama de flujo</i>	No lo presenta	Lo presenta	Lo presenta de forma ordenada y comprensible			2

<i>Identificación y tratamiento de residuos</i>	No lo presenta	Lo presenta				1
<i>Recolección de datos</i>	No los presenta	Si los presenta				1
<i>Cálculos para obtener resultados</i>	No los presenta	Si los presenta	Los presenta de forma ordenada y comprensible			2
<i>Observaciones</i>	No las presenta	Si las presenta				1
<i>Resultados</i>	No presenta los resultados	Presenta los resultados de forma desordenada	Presenta los resultados de forma ordenada			2
<i>Análisis</i>	No presenta el análisis	Presenta el análisis de forma desordenada y sin interrelacionar los resultados	Presenta el análisis de forma lógica y ordenada	Presenta el análisis de forma lógica, ordenada e interrelaciona los datos con la bibliografía consultada		3
<i>Conclusiones</i>	No las presenta	Las presenta de forma	Las presenta de forma comprensible y			2

		extensa	puntual para cada sesión			
<i>Referencias consultadas</i>	No tiene referencias	Referencias desordenadas y faltan datos adecuados para su localización	El sistema de referencias es homogéneo			2
TOTAL						47 puntos

Glosario.

El presente glosario se elaboró a partir de una amplia gama de referencias dentro de las que destaca el “Glosario de Términos Toxicológicos. Recomendaciones de la IUPAC” [92], el Glosario del libro “Química” de Raymond Chang [93] y la “Real Academia Española” [94].

Absorbancia: 1. f. Fís. Medida de la atenuación de una radiación al atravesar una sustancia, que se expresa como el logaritmo de la relación entre la intensidad saliente y la entrante.

2. f. Quím. Relación (logarítmica) entre la intensidad de la luz que incide sobre una muestra y la intensidad de esa misma luz que es transmitida a través de esa muestra.

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right)$$

Donde I= intensidad de la luz transmitida I₀=intensidad de la luz incidente

Acidez: 1. f. Cualidad de ácido.

2. f. Quím. Exceso de iones hidrógeno en una disolución acuosa, en relación con los que existen en el agua pura.

3. La teoría de Bronsted-Lowry, propone que la acidez depende de la presencia de sustancias ácidas o básicas. En esta teoría un ácido es cualquier sustancia que puede donar un protón.

4. En la teoría de Lewis los ácidos se definen como una sustancia capaz de compartir, o aceptar un par de electrones.

Adulterar: 1. tr. Alterar fraudulentamente la composición de una sustancia.

2. tr. Falsear, alterar la naturaleza de algo.

Aerosol: 1. m. Suspensión de partículas diminutas de sólidos o líquidos en el aire u otro gas.

2. m. Líquido que, almacenado bajo presión, puede ser lanzado al exterior en forma de aerosol. Se emplea mucho en perfumería, farmacia, pintura, etc.

3. m. Envase con un dispositivo especial para pulverizar el líquido que contiene.

Afinidad: f. Quím. Tendencia de los átomos, moléculas o grupos moleculares a combinarse con otros.

Aglutinación: f. Biol. y Med. Reunión masiva de células portadoras de un antígeno, suspendidas en un líquido, en presencia de su correspondiente aglutinina.

Alcalino: 1. adj. Quím. Dicho de una sustancia: Que tiene las propiedades de un álcali.

2. adj. Quím. Dicho de un metal: Que pertenece al grupo del sistema periódico formado por el litio, el sodio, el potasio, el rubidio, el cesio y el francio, caracterizados todos por ser fuertemente básicos.

3. adj. Quím. Dicho de una solución: Que tiene un pH superior a 7.

4. Sinónimo de básico. En la teoría de Bronsted-Lowry, una base es cualquier sustancia que puede aceptar un protón.

5. En la teoría de Lewis una base es una sustancia con la capacidad de compartir o donar pares de electrones.

Alcohol deshidrogenasa: 1. (ADH) (EC 1.1.1.1) es una enzima descubierta a mediados de los años 1960 en la mosca *Drosophila melanogaster* y es un dímero con un peso molecular de 80 kDa.

2. f. Quím. Enzima que metaboliza el alcohol.



Algor mortis: (del latín algor, frío, y mortis, genitivo de muerte -"de la muerte"/"de muerte"-) es la reducción de la temperatura corporal tras la muerte del individuo.

Alifático: adj. Quím. Dicho de una molécula orgánica: Que tiene estructura de cadena abierta.

Aminoácido: m. Quím. Sustancia química orgánica en cuya composición molecular entran un grupo amino y otro carboxilo.

Anafilaxia: Del fr. anaphylaxie, y este der. del gr. ἀναφυλάσσειν anaphylássein 'guardar'; cf. profilaxis.

1. f. Biol. y Med. Sensibilidad exagerada del organismo debida a la acción de ciertas sustancias orgánicas, cuando después de algún

tiempo de haber estado en contacto con él, vuelven a estarlo aun en pequeñísima cantidad, lo que produce desórdenes varios y a veces graves.

2. f. Biol. y Med. Sensibilidad excesiva de algunas personas a la acción de ciertas sustancias alimenticias o medicamentosas.

Analito: m. Es un término utilizado sobre todo en la química analítica, análisis químico, etc., donde hace referencia a una sustancia, la cual puede ser un ion, un elemento, o incluso un compuesto determinado, que posee un interés en nuestra muestra, pues es la parte que deseamos analizar.

Anfipática, molécula: son aquellas moléculas que poseen un extremo hidrofílico, es decir, que es soluble en agua y otro hidrófobo, es decir, que rechaza el agua.

Anticuerpo: **1. m. Biol. y Med.** Sustancia producida en el organismo animal por la presencia de un antígeno, contra cuya acción reacciona específicamente.

2. m. Biol. y Med. Proteínas en forma de Y producidas por el sistema inmunológico para identificar y neutralizar las sustancias dañinas y extrañas al cuerpo, llamadas antígenos. Los anticuerpos los sintetizan un tipo de leucocito o glóbulo blanco llamado linfocito B.

Anticuerpo monoclonal: **1. m. Biol. y Med.** anticuerpo específico frente a un único antígeno.

2. m. Biol. y Med. Anticuerpo homogéneo producido por un clon de células. Este clon está derivado de una célula híbrida, creada a partir de la fusión de una sola célula madre del sistema inmune y una célula plasmática tumoral.

Aromático: adj. Quím. Dicho de una molécula: Que tiene estructura cerrada no saturada.

Arteria: Del lat. arteria, y este del gr. ἀρτηρία artēría 'vaso sanguíneo'.

f. Cada uno de los vasos que llevan la sangre desde el corazón a las distintas partes del cuerpo. Su nacimiento es de un ventrículo.

- Autólisis:** Del al. Autolyse, de auto- 'auto-' y -lyse '-lisis'.
f. Biol. Degradación de las células por sus propias enzimas. Conduce a la degradación de un tejido o de un órgano.
- Axioma:** Del lat. axiōma, y este del gr. ἀξίωμα axiōma.
m. Mat. Cada uno de los principios fundamentales e indemostrables sobre los que se construye una teoría.
- Bilirrubina:** 1. f. Fisiol. Pigmento biliar de color amarillo.
2. f. Fisiol. Pigmento amarillo que se encuentra en la bilis y se forma por la degradación de la hemoglobina.
- Biopsia:** 1. f. Med. Extracción y examen de una muestra de tejido tomada de un ser vivo, con fines diagnósticos.
2. f. Med. Muestra de tejido de una biopsia.
3. f. Med. Examen microscópico de un trozo de tejido o una parte de líquido orgánico que se extrae de un ser vivo.
- Biotransformación:** Med. Transformación metabólica que en el organismo sufre la mayoría de los agentes xenobióticos. Esta transformación es catalizada, en su mayor parte, por enzimas del retículo endoplásmico de las células parenquimatosas hepáticas (microsomas hepáticos).
- Bodega de Indicios:** Lugar con características específicas que tiene como finalidad, el resguardo de indicios o elementos materiales probatorios para garantizar su integridad.
- Bolo alimenticio:** m. Alimento masticado e insalivado que de una vez se deglute.
- Cadena trófica:** 1. f. Biol. Cadena alimentaria.
2. f. Sucesión de relaciones entre los organismos vivos que se nutren unos de otros en un orden determinado.
- Carbohidrato:** 1. m. Quím. hidrato de carbono.
2. m. Quím. Sustancia orgánica formada por carbono, hidrógeno y oxígeno, en la que estos dos últimos elementos se encuentran en la proporción de dos a uno.
3. m. Biol. y Quim. Sustancia orgánica sólida, blanca y soluble en agua, que constituye las reservas energéticas de las células animales

y vegetales; está compuesta por un número determinado de átomos de carbono, un número determinado de átomos de oxígeno y el doble de átomos de hidrógeno.

Catálisis: f. Quím. Incremento de la velocidad de una reacción en presencia de un **catalizador:** adj. Quím. Dicho de una sustancia: Que, en pequeña cantidad, incrementa la velocidad de una reacción química y se recupera sin cambios esenciales al final de la reacción.

Coágulos subdurales: acumulación de sangre entre la duramadre que es la membrana que cubre el cerebro y la aracnoides, una de las capas de las meninges.

Coefficiente de distribución (D): Coeficiente de reparto (K) o coeficiente de partición (P), es el cociente o razón entre las concentraciones de esa sustancia en las dos fases de la mezcla formada por dos disolventes inmiscibles en equilibrio.

Comprimido: m. Pastilla pequeña que se obtiene por compresión de sus ingredientes previamente reducidos a polvo.

Confiabilidad: f. fiabilidad (||probabilidad de buen funcionamiento de algo).

Contador de centelleo: es uno de los detectores de partículas más versátiles y es ampliamente utilizado en industria, investigación científica, diagnóstico médico y monitoreo de radiación, así como en la exploración de petróleo y minerales radiactivos que emiten rayos gamma.

Coprecipitación: Precipitación simultánea de dos o más componentes dentro de una mezcla líquida, coloidal o emulsionada.

Cromóforo: 1. adj. Quím. Dicho de un agrupamiento químico: Que causa la coloración de una sustancia. U. t. c. s. m.

2. Quim. Región molecular donde la diferencia de energía entre dos orbitales moleculares cae dentro del rango del espectro visible. La luz visible que incide en el cromóforo puede también ser absorbida excitando un electrón a partir de su estado de reposo.

Cúmulo: 1. m. montón (|| conjunto sin orden).

2. m. Quím. Agrupamiento o racimo de átomos o moléculas que son intermedias en tamaño entre una molécula y un bulk sólido.

Dacrón: m. Fibra sintética de poliéster que se utiliza principalmente en la industria textil para fabricar tejidos resistentes.

Dalton: Del ingl. dalton, y este de J. Dalton, 1766-1844, físico y químico inglés.

m. Fís. Unidad de masa atómica equivalente a 1/12 de la masa de carbono 12, muy utilizada en bioquímica y en biología molecular.

(Símb. Da). Equivale a $1.660\ 538\ 921\ (73) \times 10^{-27}$ kg (valor recomendado por CODATA).

Deflagración: Combustión rápida con llama y sin explosión (||Deflagrar. intr. Dicho de una sustancia: Arder súbitamente con llama y sin explosión.)

Densidad óptica: 1. f. Fís. Magnitud física que mide la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia. Mientras más alta es la densidad óptica, más corta es la transmitancia.

2. f. Ópt. Grado de absorción de la luz por un medio transparente.

Desorción: Del ingl. desorption, de- 'de-' y adsorption 'adsorción'.

f. Tecnol. Emisión de un fluido previamente adsorbido por un material.

Detoxificación: f. (Terapéutica) Proceso de eliminación de sustancias tóxicas.

Difusión: 1. m. Fís. Proceso irreversible, en el que partículas o moléculas se introducen en un medio en el que inicialmente estaban ausentes, aumentando la entropía del sistema conjunto formado por las partículas difundidas o soluto y el medio donde se difunden o disuelven.

2. m. movimiento de las moléculas de una región de alta concentración a otra de menor concentración, producido por la energía cinética de las moléculas.

Digestión: 1. f. Quím. Descomposición de las moléculas, sustancias o tejidos por la acción de ácidos minerales y/o enzimas.

2. f. Biol. y Med. Descomposición de la comida en la boca, estómago e intestinos a través del uso de ácidos y enzimas.

- Diluir:** 1. tr. Disolver algo por medio de un líquido.
2. tr. Disminuir la concentración de una disolución añadiendo disolvente.
- Electrodo:** m. Fís. Extremo de un conductor en contacto con un medio, al que transmite o del que recibe una corriente eléctrica.
- Elemento material probatorio:** Evidencia física, objeto, instrumento o producto relacionado con un hecho delictivo y que puede constituirse como prueba.
- Elemento refractario:** m. Quím. Cuerpo que resiste la acción del fuego sin cambiar de estado ni Descomponerse. Es decir, se considera como material refractario a todo aquel compuesto o elemento que es capaz de conservar sus propiedades físicas, químicas y mecánicas a elevada temperatura.
- Eluir:** tr. Quím. Extraer, mediante un líquido apropiado, una sustancia del medio sólido que la ha absorbido.
- Eluyente:** (química analítica) En la cromatografía, un disolvente utilizado con el fin de efectuar la separación por elución.
- Embeber:** 1. tr. Dicho de un cuerpo sólido: Absorber a otro líquido.
2. tr. Empapar, llenar de un líquido algo poroso o esponjoso.
3. tr. Dicho de una cosa: Contener o encerrar dentro de sí a otra.
4. tr. Dicho de una cosa inmaterial: Incorporar o incluir dentro de sí a otra.
5. tr. Encajar, embutir o meter algo dentro de otra cosa.
- Emulsión:** f. Quím. Dispersión de un líquido en otro no miscible con él. La emulsión de aceite en agua.
- Endocitosis:** Med. Proceso por el cual la célula introduce moléculas grandes o partículas, y lo hace englobándolas en una invaginación de la membrana citoplasmática, formando una vesícula que termina por desprenderse de la membrana para incorporarse al citoplasma.
- Endosoma:** Med. Orgánulo de las células animales y fúngicas delimitados por una sola membrana de clatrina, que transporta material que se acaba de

incorporar por endocitosis, mediada por un receptor en el dominio extracelular en el lugar que se inicia la invaginación.

Energía electromagnética: f. Fís. Cantidad de energía almacenada en una región del espacio que podemos atribuir a la presencia de un campo electromagnético, y que se expresará en función de las intensidades del campo magnético y campo eléctrico.

Enzima: Del al. Enzym, y este del gr. ἐν en 'en' y ζύμη zýmē 'levadura'; cf. gr. bizant. ἔνζυμος énzymos 'que tiene levadura'.

m. o f. Bioquím. Proteína que cataliza específicamente una reacción bioquímica del metabolismo. U. menos c. m.

Estándar: 1. adj. Que sirve como tipo, modelo, norma, patrón o referencia.

2. m. Tipo, modelo, patrón, nivel.

Estéril: adj. Libre de gérmenes patógenos.

Excitado: m. Fís. estado de un átomo, de un núcleo o, en general, de cualquier sistema cuántico, cuya energía es superior a la del estado fundamental.

Exotérmico: adj. Fís. Dicho de un proceso: Que va acompañado de desprendimiento de calor.

Experticia: 1. f. Experiencia adquirida a través de la práctica e investigación acerca de nuestra especialidad o trabajo en el cual nos desempeñamos y nos da cierta autoridad pronunciarnos sobre ello.

2. f. Inspección, verificación o revisión pericial exhaustiva de un objeto, proceso, situación, o evento, llevada a cabo por personas calificadas y competentes en el asunto a someter a tal inspección pericial.

Extractante: m. Quím. Líquido inmiscible utilizado para extraer una sustancia de otro líquido

Extracto: m. Quím. Sustancia que, en forma concentrada, se extrae de otra, de la cual conserva sus propiedades.

- Fagocitosis:** f. Biol. Captura de partículas microscópicas que realizan ciertas células con fines alimenticios o de defensa, mediante la emisión de pseudópodos.
- Falciforme:** adj. Que tiene forma de hoz.
- Fermentar:** 1. Quím. Transformarse químicamente [una sustancia orgánica] en otra, generalmente más simple, por la acción de un fermento (|| Fermento. Cosa que origina o estimula algo).
2. ntr. Dicho de un hidrato de carbono: Degradarse por acción enzimática, dando lugar a un producto más sencillo, como el alcohol etílico.
- Filamento:** m. Fís. Hilo en espiral que genera luz por acción de la temperatura
- Filtrado glomerular:** Proceso efectuado en el riñón que permite una depuración de la sangre a medida que ésta fluye a través de los capilares glomerulares; el agua y las sustancias contenidas en la sangre se filtran y se dirigen hacia la cápsula de Bowman.
- Fluorescencia:** f. Fís. Luminiscencia debida a la excitación de una sustancia que absorbe radiaciones, y que cesa al desaparecer dicha excitación.
- Folículo:** m. Anat. Glándula, en forma de saco, situada en el espesor de la piel o de las mucosas.
- Genotipo:** Del al. Genotypus, y este del gr. γένος génos 'raza', 'linaje', 'prole' y τύπος týpos 'tipo'.
m. Biol. Conjunto de los genes de un individuo, de acuerdo con su composición alélica.
- Glucurónido:** m. Bioquím. Cualquiera de varios derivados de ácido glucurónico formado durante el metabolismo de fenoles, etc., que sirven para eliminarlos de la corriente sanguínea
- Gradiente:** m. Fís. Razón entre la variación del valor de una magnitud en dos puntos próximos y la distancia que los separa.
- Grupo funcional:** m. Quím. Átomo o conjunto de átomos que confieren a una molécula orgánica propiedades químicas características.

Hapteno: m. Bioquím. Sustancia química de pequeño peso molecular (menos de 10.000 daltones) que no induce por sí misma la formación de anticuerpos pero al unirse a una proteína transportadora como la albúmina estimula una respuesta inmunitaria.

Hepatocito: 1. m. Anat. Tipo de célula presente en el tejido parenquimatoso hepático.
2. m. Anat. Célula propia del hígado y que forma su parénquima. Los lobulillos hepáticos son subunidades irregularmente hexagonales formadas por láminas fenestradas de hepatocitos que se disponen en forma radiada en torno a una vena central o vena centrolobulillar, ubicada en el centro del lobulillo.

Hepatotoxicidad: f. Med. Capacidad de una sustancia para causar daño a las células del hígado.

Hermético: 1. adj. Que se cierra de tal modo que no deja pasar el aire u otros fluidos.

2. adj. Impenetrable, cerrado, aun tratándose de algo inmaterial.

Hidrófilo: adj. Dicho de una materia o una sustancia: Que adsorbe el agua con gran facilidad.

Hidrólisis: 1. f. Quím. Desdoblamiento de una molécula por la acción del agua.

2. f. Quím. Formación de un ácido y una base a partir de una sal por interacción con el agua.

3. f. Quím. Descomposición de sustancias orgánicas por acción del agua.

Hilio: m. Anat. Depresión en la superficie de un órgano, que señala el punto de entrada y salida de los vasos o de los conductos secretores.

Hipostasis: 1. Med. Formación de un depósito especialmente de sangre en un punto declive por deficiencia de la circulación.

2. **Hipostasis cadavérica:** manchas azuladas en las partes más declives del cuerpo que se observan después de la muerte

3. **Hipostasis pulmonar:** congestión en las partes declives del pulmón en los sujetos mantenidos en supino

- Hipoxia:** f. Med. Déficit de oxígeno en un organismo.
- Homeostasis:** 1. f. Biol. Conjunto de fenómenos de autorregulación, que conducen al mantenimiento de la constancia en la composición y propiedades del medio interno de un organismo.
2. f. Autorregulación de la constancia de las propiedades de un sistema influido por agentes exteriores.
- Ictericia:** f. Med. Coloración amarilla de la piel y las mucosas, debida a un incremento de pigmentos biliares en la sangre.
- Ilícito:** 1. adj. No permitido legal o moralmente.
2. m. Méx. delito (ll quebrantamiento de la ley).
- Incidencia, ángulo de:** m. Ópt. ángulo formado por una trayectoria con la normal a la superficie de un medio, en el punto en el que lo encuentra.
- Indicio:** Término genérico empleado para referirse a huellas, vestigios, señales, localizados, descubiertos o aportados que pudieran o no estar relacionados con un hecho probablemente delictivo y, en su caso, constituirse en un elemento material probatorio.
- Inmunocomplejo:** m. Fisiol. Complejo formado por moléculas de anticuerpo unidas a un antígeno.
- Inmunoensayo:** Conjunto de técnicas inmunoquímicas analíticas de laboratorio que tienen en común el usar complejos inmunes, es decir los resultantes de la conjugación de anticuerpos y antígenos.
- Inmunoglobulina:** f. Biol. Proteína presente en el suero sanguíneo y otras secreciones con capacidad para combinarse específicamente con el antígeno que se encuentra en el origen de su producción.
- In-situ:** loc. adv. En el lugar, en el sitio.
- Interfase:** 1. f. Biol. Período entre dos divisiones sucesivas de una célula.
2. f. Fís. y Quím. Superficie de separación entre dos fases.
- Ion:** m. Fís. y Quím. Átomo o agrupación de átomos que por pérdida o ganancia de uno o más electrones adquiere carga eléctrica.
- Ionizar:** tr. Fís. y Quím. Disociar una molécula en iones o convertir un átomo o molécula en ion.

- Isocrático:** adj. Quím. (de un sistema de HPLC), que resuelve un soluto utilizando un sistema disolvente que no cambia la composición durante la carrera.
- Isómero:** 1. adj. Quím. Dicho de dos o más cuerpos: Que, con igual composición química, tienen distintas propiedades físicas.
2. adj. m. y f. Quím. [Molécula] Que está compuesta por los mismos elementos, y en las mismas proporciones, que otra u otras, pero que difiere en algunas propiedades a causa de una diferencia en la estructura molecular.
- Isótopos:** 1. m. Fís. y Quím. Cada uno de los elementos químicos que poseen el mismo número de protones y distinto número de neutrones.
2. m. Quím. Átomo que pertenece al mismo elemento químico que otro, tiene su mismo número atómico, pero distinta masa atómica.
- Lípido:** m. Bioquím. Cada uno de los compuestos orgánicos que resultan de la esterificación de alcoholes, como la glicerina y el colesterol, con ácidos grasos.
- Lipofílico:** adj. m. Bioquím. Que tiene afinidad por las grasas y gran solubilidad en los lípidos posee la propiedad fisicoquímica que favorece el equilibrio de partición o reparto de un soluto entre el agua y un disolvente orgánico inmiscible, a favor de éste influye en la absorción y bioacumulación.
- Liposoluble:** Que es soluble en grasas o aceites.
- Lisosoma:** m. Biol. Orgánulo celular constituido por una vesícula membranosa cargada de enzimas que participan en la digestión intracelular.
- Longitud de onda:** f. Fís. Distancia entre dos puntos correspondientes a una misma fase en dos ondas consecutivas.
- Maceración:** 1. tr. Ablandar algo estrujándolo o golpeándolo.
2. tr. Mantener sumergida alguna sustancia sólida en un líquido a la temperatura ambiente, con el fin de ablandarla o de extraer de ella las partes solubles.

Macrófagos: m. Biol. y Med. Células importantes del sistema inmune que se forman en respuesta a una infección o a acumular las células dañadas o muertas. Los Macrófagos son las células grandes, especializadas que reconocen, engullen y destruyen las células de meta.

Mensurable: adj. Que se puede medir.

Metabolito: 1. m. Fisiol. Producto del metabolismo.
2. m. Fisiol. Cualquier sustancia producida durante el metabolismo (digestión u otros procesos químicos corporales).
3. m. Fisiol. Producto que queda después de la descomposición (metabolismo) de un fármaco por parte del cuerpo.

Micción: 1. f. Acción de orinar (ll expeler la orina).
2. f. orina.

Miscibilidad: Quím. Término que se refiere a la propiedad de algunos líquidos para mezclarse en cualquier proporción, formando una disolución. En principio, el término es también aplicado a otras fases (sólidos, gases), pero se emplea más a menudo para referirse a la solubilidad de un líquido en otro.

Mismidad: 1. f. Fil. Condición de ser uno mismo.
2. f. Fil. Aquello por lo cual se es uno mismo.
3. f. Fil. Identidad personal.

Monocromador: Fís. dispositivo óptico que permite, por medio de un mecanismo, seleccionar y transmitir una estrecha banda de longitudes de onda ya sean electromagnéticas o no a partir de una fuente emisora que produzca una amplia gama de longitudes de onda.

Nebulizador: m. Fís. Instrumento o dispositivo para pulverizar o esparcir un líquido en gotas muy finas.

Necropsia: f. Examen anatómico de un cadáver.

Neuroléptico: adj. Med. Que ejerce una acción calmante sobre el sistema nervioso.

- Órgano diana:** Fisiol. Parte del cuerpo en la que una sustancia química origina efectos adversos. Puede ser un órgano íntegro, un tejido, una célula o tan solo un componente subcelular.
- Parenteral:** adj. Med. Que se introduce en el organismo por vía distinta de la digestiva, como la intravenosa, la subcutánea, la intramuscular, etc.
- Pastilla:** f. Pequeña porción de sustancia medicinal.
- Patrón:** m. Quím. Estándar primario es una sustancia utilizada en química como referencia al momento de hacer una valoración o estandarización. Usualmente son sólidos que cumplen con las siguientes características: 1. Tienen composición conocida. 2. Deben tener elevada pureza. 3. Debe ser estable a temperatura ambiente. 4. Debe ser posible su secado en estufa. 5. No debe absorber gases. 6. Debe reaccionar rápida y estequiométricamente. 7. Debe tener un peso equivalente grande.
- Péptido:** m. Bioquím. Molécula formada por la unión covalente de dos o más aminoácidos.
- Peritoneo:** m. Anat. Membrana serosa, propia de los vertebrados y de otros animales, que reviste la cavidad abdominal y forma pliegues que envuelven las vísceras situadas en esta cavidad.
- PFT:** Personal Facultado para el Traslado. Es quien debe llevar a cabo el traslado de los indicios o elementos materiales probatorios, debidamente embalados, sellados, etiquetados, firmados y con el registro de Cadena de Custodia.
- pH:** m. Quím. Índice que expresa el grado de acidez o alcalinidad de una disolución.
- Pigmento:** 1. m. Biol. Sustancia colorante que, disuelta o en forma de gránulos, se encuentra en el citoplasma de muchas células vegetales y animales.
2. Pigmento respiratorio. m. Biol. Proteína conjugada que transporta oxígeno en los fluidos corporales, por lo general en la sangre; p. ej., la hemoglobina.

- Píldora:** f. Bola pequeña que se hace mezclando un medicamento con un excipiente adecuado para ser administrado por vía oral.
- pKa:** Quím. Medida de la acidez de una sustancia obtenida a partir del logaritmo negativo de su constante de disociación ácida K_a .
- Placa de toques:** Placa de porcelana con excavaciones o pozos que se usa para realizar reacciones químicas en escala pequeña.
- Plasma:**
1. m. Biol. Parte líquida de la sangre o de la linfa, que contiene en suspensión sus células componentes.
 2. m. Biol. Sangre o linfa desprovistas de sus células.
 3. m. Fís. Gas ionizado que se produce a temperaturas extremadamente elevadas y que contiene cargas positivas y negativas en un número aproximadamente igual.
- Polaridad:**
1. f. Fís. Propiedad que tienen los agentes físicos de acumularse en los polos de un cuerpo y de polarizarse.
 2. f. Condición de lo que tiene propiedades o potencias opuestas, en partes o direcciones contrarias, como los polos.
- Polimorfismo:**
1. m. Biol. Propiedad de las especies de seres vivos cuyos individuos pueden presentar diferentes formas o aspectos, bien por diferenciarse en castas, como las termitas, bien por tratarse de distintas etapas del ciclo vital, como la oruga y la mariposa.
 2. m. Bioquím. Propiedad de los ácidos nucleicos y las proteínas que pueden presentarse bajo varias formas moleculares.
 3. m. Quím. Propiedad de los elementos y sus compuestos, que pueden cambiar de forma sin variar su naturaleza.
- Diferencia de potencial:** f. Fís. Diferencia de potencial eléctrico entre dos puntos de un circuito.
- Precisión:** f. Fís. Ajuste completo o fidelidad de un dato, cálculo, medida, expresión, etc.
- Presión osmótica:** 1. f. Fís. presión que ejercen las partículas del disolvente en una disolución sobre la membrana semipermeable que la separa de otra de mayor concentración.

2. f. Fís. Fuerza que ejerce un gas, un líquido o un sólido sobre una superficie.

Presunción: f. Der. Consideración o aceptación de una cosa como verdadera o real a partir de ciertas señales o indicios, sin tener certeza completa de ello.

Proteasas: f. Bioquím. Enzima que fragmenta las proteínas.

Putrefacción: 1. f. Acción y efecto de pudrir.

2. f. Descomposición de una materia o una sustancia por la acción de diversos factores y de determinados microorganismos.

Quimo: m. Fisiol. Pasta homogénea y agria, variable según los casos, en que los alimentos se transforman en el estómago por la digestión.

Radiación electromagnética: f. Fís. Tipo de campo electromagnético variable, es decir, una combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes, que se propagan a través del espacio transportando energía de un lugar a otro.

Reflectancia: f. Fís. Propiedad de un cuerpo de reflejar la luz.

Reflexión: f. Fís. Cambio de dirección o de sentido de la luz, del calor o del sonido cuando se les interpone un obstáculo.

Refracción: f. Fís. Cambio de dirección de un rayo de luz u otra radiación que se produce al pasar oblicuamente de un medio a otro de distinta densidad.

Resonancia: 1. f. Quím. Estado de ciertas moléculas cuya estructura y propiedades resultan de la contribución de varias fórmulas de valencia.

2. f. Fís. Fenómeno que se produce al coincidir la frecuencia propia de un sistema mecánico, eléctrico, etc., con la frecuencia de una excitación externa.

Rigor mortis: m. Expresión latina que significa 'rigidez cadavérica' y hace referencia a la rigidez o endurecimiento del cuerpo después de la muerte.

Sanitización: m. Proceso que logra reducir la cantidad de microorganismos a un nivel de seguridad. Oficialmente un sanitizador puede reducir los microorganismos hasta un 99.999%, esto fue corroborado mediante una prueba científica dentro de un rango de 30 segundos.

Screening: 1. Med. anglicismo utilizado para indicar una estrategia aplicada sobre una población para detectar una enfermedad en individuos sin signos o síntomas de esa enfermedad.

2. Sinónimo de tamizado.

Sebo: m. Grasa que segregan unas glándulas que tienen las personas y algunos animales en la piel y que sirve para lubricarla, protegerla y mantenerla blanda.

Sedimentar: prnl. Dicho de las materias suspendidas en un líquido: Formar sedimento.

Sedimento: 1. m. Materia que, habiendo estado suspensa en un líquido, se posa en el fondo por su mayor gravedad. U.t. en sent. fig.

2. m. Conjunto de partículas sólidas que queda depositado en el fondo del recipiente que contiene un líquido.

Sinergia: 1. Incremento de la acción de diversas sustancias debido a que actúan conjuntamente.

2. f. Acción de dos o más causas cuyo efecto es superior a la suma de los efectos individuales.

3. f. Biol. Concurso activo y concertado de varios órganos para realizar una función.

Sobredosis: f. Dosis excesiva de un medicamento o de una droga, que suele causar intoxicación y puede llegar a provocar la muerte.

Solubilidad: f. Capacidad de una sustancia o un cuerpo para disolverse al mezclarse con un líquido

Solución hipotónica: f. Biol. Aquella que tiene menor concentración de soluto en el medio exterior en relación al medio interior de la célula, es decir, en el interior de la célula hay una cantidad de sal mayor que de la que se encuentra en el medio en la que ella habita.

- Soluto:** 1. adj. Quím. Dicho de un cuerpo: Que está disuelto.
2. m. Quím. Sustancia que está disuelta en otra.
- Sorbente:** m. Quím. Material utilizado para absorber líquidos o gases.
- Surfactante:** 1. adj. Quím. tensoactivo.
2. adj. Quím. Dicho de un compuesto: Que reduce la tensión superficial del líquido al que se añade.
3. m. Bioquím. Sustancia compleja que contiene fosfolípidos y un número de apolipoproteínas. Este líquido esencial es producido por las células alveolares Tipo II, y cubre los alveolos y pequeños bronquiolos.
- Sustrato:** m. Bioquím. Sustancia sobre la que actúa una enzima.
- Tableta:** f. Medicamento en forma de pastilla, generalmente plano y de pequeño tamaño, que suele tomarse sin deshacer.
- Tamizado:** 1. En toxicología analítica: ensayos o análisis simples dirigidos a detectar en una muestra la presencia de los tóxicos más probables.
2. En farmacología o toxicología experimental: ensayos o procedimientos para caracterizar determinadas propiedades farmacológicas o tóxicas en un compuesto o en una serie de ellos. Sinónimo de cribado.
- Tanatoquimia:** f. Estudio de la evolución de las transformaciones bioquímicas que ocurren en el cadáver y su evolución en el tiempo.
- Tejido adiposo:** 1. m. Biol. tejido formado exclusivamente por células que contienen en su citoplasma una voluminosa gota de grasa o muchas gotitas de grasa dispersas.
2. m Biol. Variedad especializada de tejido conjuntivo; integrado por un grupo de células denominadas adipocitos o células adiposas, especializadas en almacenar grasas o lípidos, sustancias consideradas como la fuente de reserva de energía química más importante de un organismo animal.
- Temporalidad:** f. Cualidad de lo que es temporal y tiene una duración determinada y limitada.

Tiempo de vida media ($t_{1/2}$): 1. f. Biol. Tiempo requerido para que la cantidad de una sustancia presente en un sistema biológico se reduzca a la mitad, predominantemente por procesos biológicos, cuando el ritmo de eliminación es aproximadamente exponencial.

2. Tiempo de vida media metabólica. f. Biol. Tiempo requerido para que la mitad de la cantidad de una sustancia contenida en el cuerpo se transforme metabólicamente en un derivado o se elimine.

3. Tiempo de vida media de eliminación. f. Biol. Período que tarda el organismo en disminuir a la mitad la concentración sanguínea de una sustancia. Sinónimo de tiempo de vida media plasmática.

Tolerancia: 1. Capacidad de un organismo para experimentar exposición a dosis nocivas de una sustancia sin sufrir efectos adversos.

2. Capacidad de un organismo para sobrevivir en presencia de una sustancia tóxica: se puede adquirir aumento de la tolerancia por adaptación a exposición constante o incrementada.

3. Estado adaptativo caracterizado por disminución de los efectos de determinadas dosis de una sustancia; tiene interés en terapéutica, drogadicción, toxicología alimentaria, ocupacional y ambiental.

4. En inmunología: estado de falta de respuesta inmunitaria

Toxicocinética: f. Expresión en términos matemáticos de los procesos que experimenta una sustancia tóxica en su tránsito por el cuerpo (absorción, distribución, biotransformación y eliminación). Considera la velocidad de los procesos y las variaciones de las concentraciones de las sustancias originales y de sus metabolitos en los compartimientos. El término farmacodinámica, tenido como sinónimo se ha concretado a los productos de interés medicamentoso; además existen diferencias entre farmacodinámica y toxicodinámica por la orientación y finalidad de los estudios y las distintas dosis y características de las sustancias que se consideran.

Toxicodinamia: f. Proceso de interacción de una sustancia tóxica con los lugares diana, y las consecuencias bioquímicas y fisiopatológicas que conducen a los efectos tóxicos.

Transmitancia: f. Fís. Cantidad de energía que atraviesa un cuerpo en determinada cantidad de tiempo. Existen varios tipos de transmitancia, dependiendo de qué tipo de energía se considere. La transmitancia óptica se refiere a la cantidad de luz que atraviesa un cuerpo, en una determinada longitud de onda.

Traza: 1. f. Quím. Elemento presente en una muestra que posee una media de concentración menor de 100 partes por millón, realizando la medición en un contador atómico, o menor de 100 microgramos por gramo.

2. f. Geoquím. Elemento químico cuya concentración es menor de 1000 partes por millón o menor del 0.1 % de la composición de una roca.

Trazabilidad: 1. f. Posibilidad de identificar el origen y las diferentes etapas de un proceso.

2. f. Propiedad de un resultado de medida que permite relacionarlo con una referencia superior mediante una cadena documentada de calibraciones.

Vacutainer: Tubos al vacío que se utilizan habitualmente para los análisis de sangre.

Validez: 1. Expresión del grado en el que una medida se ajusta a la realidad.

2. Grado de garantía de las inferencias que se hacen de un estudio, especialmente de las generalizaciones que trascienden a la muestra, teniendo en cuenta los métodos utilizados, la representatividad de la muestra y la naturaleza de la población de la que aquélla se ha extraído.

Vena: f. Cada uno de los vasos o conductos por donde retorna la sangre al corazón.

Venopunción: f. Punción que se hace en una vena para extraer sangre o para inyectar algo.

Volatilidad: adj. Fís. Dicho de un líquido: Que se transforma espontáneamente en vapor.

Volumen de distribución: 1. Volumen aparente (hipotético) del fluido corporal necesario para contener la cantidad total de una sustancia a la misma concentración a la que se encuentra en el plasma o en la sangre total, asumiendo que se ha alcanzado el equilibrio.

2. Parámetro matemático que relacione la cantidad de fármaco en el cuerpo con la concentración plasmática. Se define habitualmente como el volumen de líquido del cuerpo en el cual el fármaco aparentemente se disuelve.

Xenobiótico: 1. En sentido estricto, cualquier sustancia que interactúa con un organismo y que no es uno de sus componentes naturales. Sinónimo de sustancia exógena.

2. Todo compuesto químico que no forme parte de la composición de los organismos vivos.

5. Evidencia de Resultados.

Para presentar evidencia de los resultados obtenidos con el diseño y el uso del manual de laboratorio, en esta sección se reportan algunos de los trabajos realizados por los alumnos de la segunda generación de la LCF que han empleado el material didáctico como guía para su aprendizaje.

Dado que el resultado final del ejercicio de Investigación Dirigida que obtuvieron los alumnos a lo largo del curso se comunica con la **recapitulación global** de la resolución problemática, se aborda en mayor medida, la evidencia de los dictámenes de los alumnos. De forma complementaria, se anexa evidencia reportada en bitácoras del curso de laboratorio, sin embargo, la información contenida en el dictamen es, la misma que se encuentra en la bitácora por lo cual sólo se anexan un par de ilustraciones con respecto a ellas.

Aunado a esto, la rúbrica de elaboración y evaluación de los dictámenes es sin duda alguna, una pieza fundamental en el modelo del ABC que al ser proporcionada a los alumnos al inicio del curso, sirve también como una guía sobre las características clave que se deben alcanzar para lograr un buen desempeño.

Debido a que mostrar los dictámenes completos o las bitácoras de los alumnos en su totalidad es una tarea impráctica, para plasmar de forma concreta el trabajo realizado, solamente se adjuntan secciones elementales que muestren la apropiación de conocimientos por parte de los alumnos; así pues, en las ilustraciones que se muestran a continuación, ha sido resaltada la información relevante que evidencia la comprensión de los conceptos pretendidos.

En la Ilustración 2 se muestra cómo los alumnos, a partir de la situación problemática, plantean el problema dándole importancia al contexto humanista ya que la aplicación de la toxicología en el ámbito forense es para dar resolución no sólo a las cuestiones científico-técnicas, sino también a las jurídicas y por ende, a las que dependen de los contextos sociales. Lo anterior significa que no sólo dotaron de relevancia a la identificación y cuantificación de sustancias, sino a su vez, lo que implicaría su presencia o ausencia. De igual forma logran fragmentar la situación problemática al extraer objetivos particulares que terminarán siendo las pautas para la resolución del problema general.

ANTECEDENTES		
Ricardo Carrillo Medina murió camino al hospital después de presentar síntomas como ansiedad, confusión mental, calambres, dolores musculares, dolor abdominal, vómito, diarrea y convulsiones. El médico forense dictaminó que la muerte se presentó como resultado de una falla cardiopulmonar, encontrando edema pulmonar de origen no cardiogénico. Su esposa reportó que los síntomas se presentaron después de regresar de comer con su compadre quien es dueño de algunos cultivos vegetales.		
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA		
Objetivo general		
<u>Determinar si la muerte del Sr. Ricardo Carrillo Medina fue causada por un xenobiótico tóxico.</u>		
Objetivos particulares		
I.	<u>Diseñar una línea de investigación</u>	para los agentes tóxicos que probablemente se puedan encontrar en las muestras disponibles basándose en la sintomatología presentada.
II.	<u>Determinar las características de las muestras y el estado en el que se reciben.</u>	
III.	<u>Realizar el procedimiento de preparación de muestras</u>	de acuerdo a las características del posible xenobiótico.
IV.	<u>Realizar las pruebas presuntivas que permitan orientarnos</u>	y nos ayuden a descartar la presencia de los posibles agentes tóxicos.
V.	<u>Realizar las pruebas confirmatorias que permitan establecer con certeza la presencia del xenobiótico</u>	en las muestras analizadas.
LCF/TOX/2016/3-2	10/03/2016	2

Ilustración 2. Fragmento de dictamen (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Se observa el planteamiento de problemas y problemas específicos a manera de puntos de avance en la resolución de la situación problemática.

Un aspecto necesario de resaltar es que en los objetivos particulares ellos se muestran como los principales autores al asumir el diseño de la línea de investigación lo que dista en gran medida de los modelos tradicionales en donde sólo se almacenan y repiten protocolos. De igual forma plasman los extractos importantes en su actuar ya que denotan los pasos a seguir en su investigación que es la recepción de muestras, preparación de muestras, pruebas presuntivas y finalmente, pruebas de confirmación.

En la Ilustración 3 se puede observar como desde el inicio existe la necesidad de una búsqueda bibliográfica que los impulse a avanzar en la resolución de su problema general.

<p>Análisis del caso</p> <p><u>De acuerdo a la sintomatología reportada</u> correspondiente a ansiedad, confusión mental, calambres, dolores musculares, dolor abdominal, vómito, diarrea y convulsiones, llevando a la muerte por falla cardiorrespiratoria con edema pulmonar de origen no cardiogénico podemos sospechar principalmente del uso de <u>pesticidas del tipo organofosforados o carbamatos</u> ya que la <u>fFuente de exposición</u> de la que se sospecha es la comida procedente de cultivos vegetales de auto producción.</p> <p>LCF/TOX/2016/3-2 10/03/2016 3</p>
--

Ilustración 3. Fragmento de dictamen (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Se observa la relación entre la sintomatología y las posibles opciones a considerar como agentes causales.

MATERIAL DE ESTUDIO

Se nos entregaron cinco muestras biológicas, tomadas al C. Marciano Monsanto, a las cuales se les realizaron análisis toxicológicos para poder responder a la solicitud realizada. A continuación, se enlistan las muestras recibidas:

Identificación de indicio: MSA4-1

Descripción: Sangre.

Fecha y hora de recolección: 03/02/2016 11:05 am

Fecha de recepción en laboratorio: 04/02/2016

Características: El recipiente contenedor de la muestra biológica funge como empaque y embalaje, consta de un tubo de plástico (5 mL) con tapón color rojo, etiquetado con los respectivos datos; no cuenta con sello de seguridad que permita saber si hubo alguna transgresión. Se encontraba a una temperatura inferior a la del ambiente al momento de ser entregada.

Identificación de indicio: MSA4-2

Descripción: Sangre con anticoagulante.

Fecha y hora de recolección: 03/02/2016 11:05 am

Fecha de recepción en laboratorio: 04/02/2016

Características: El recipiente contenedor de la muestra biológica funge como empaque y embalaje, consta de un tubo de plástico (5 mL) con tapón de color amarillo, indicando que contiene anticoagulante; está etiquetado con los respectivos datos y no cuenta con sello de seguridad que permita saber si hubo alguna transgresión. Se encontraba a una temperatura inferior a la del ambiente al momento de ser entregada.

Identificación del indicio: MOR4-1

Descripción: Orina.

Fecha y hora de recolección: 03/02/2016 11:10 am

Fecha de recepción en laboratorio: 04/02/2016

Características: La muestra biológica se encuentra almacenada en un recipiente de plástico (50 mL) de boca ancha y tapa color roja, etiquetado con los respectivos datos, no cuenta con sello de seguridad que permita saber si hubo alguna transgresión. Dicho recipiente funge

LCF/TOX/2016/1/4

10/03/2016

2

Ilustración 4. Fragmento de dictamen (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Se observa el reporte, adicional al registro de cadena de custodia, de las características de las muestras recibidas y su(s) empaque(s)/embalaje.

En la Ilustración 4 los alumnos hacen referencia sobre las muestras recibidas y las características de su empaque y/o embalaje.

En la Ilustración 5 se resalta el hecho de que los alumnos comprenden la diferencia entre los conceptos de “método” y “técnica”. En esta ilustración en particular podemos notar como se hace consiente el empleo del método científico que es una pieza fundamental en los modelos innovadores que pretenden dotar al alumno de la habilidad de aprender a aprender a través de la enseñanza de las ciencias.

MÉTODO

Se utilizó el método analítico y el método científico durante todo el proceso en la resolución del caso.

El método analítico comprende en estudio de los objetos y consiste en descomponerlo en sus partes para analizarlo y tener la completa certeza de qué se trata. En este caso se refleja en que para poder determinar de qué sustancias se trataba se tuvo que analizar a profundidad cada una de las muestras otorgadas.

El método científico se aplicó durante todo el proceso y sirvió para estructurar la investigación siguiendo los pasos que éste comprende: observación; qué es lo que arroja el caso a resolver y qué relación tiene con las muestras proporcionadas, formulación de la hipótesis; que es lo que se espera encontrar en las muestras, como el posible xenobiótico y cómo se relaciona con el caso, experimentación; que es una parte fundamental que consistió en realizar todos los análisis pertinentes a cada una de las muestras, como las extracciones líquido-líquido, las cromatografías en capa fina y de líquidos como pruebas presuntivas y confirmatorias respectivamente, esperando así poder encontrar la sustancia de la que se sospechaba, análisis de resultados; una vez que se obtuvieron los resultados de las pruebas confirmatorias se procedió a determinar la relación que guardan éstos con el caso planteado, comprobación; que fue el comprobar mediante referencias bibliográficas que realmente coincidían los resultados con el caso.

TÉCNICAS EMPLEADAS

- Extracción líquido-líquido con diclorometano y acetonitrilo: Esta técnica se usó para extraer los metabolitos de las matrices biológicas en las que se encontraban, se usó debido al estado líquido de las muestras. Se llevó a cabo por triplicado en las muestras de sangre y orina, en el cual se empleó el diclorometano y sólo una ocasión para la muestra de contenido gástrico y en este caso el reactivo empleado fue acetonitrilo. En el caso de muestras de orina se empleó también ácido clorhídrico concentrado para realizar una hidrólisis, esto para evitar que el xenobiótico se encuentre conjugado con algún otro compuesto (conjugados con sulfatos o con glucurónidos)

3

LCF/TOX/2016/3-1

Ilustración 5. Fragmento de dictamen (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Se observa la diferenciación entre el concepto de método y técnica.

En las Ilustración 6, 7 y 8 se observan los diagramas de flujo planteados para las matrices asignadas. Adicional a los diagramas de flujo se reportan detalladamente las técnicas empleadas con su correspondiente reporte de materiales, reactivos y cálculos para cada una de ellas.

Cabe mencionar que en este reporte más detallado de las técnicas, se encuentran también los procesos de preparación de muestra como la homogeneización, desproteinización, hidrólisis y la extracción, sin embargo no serán incluidas dichas ilustraciones por cuestiones prácticas, sólo se hará evidente en cada uno de los diagramas de flujo.

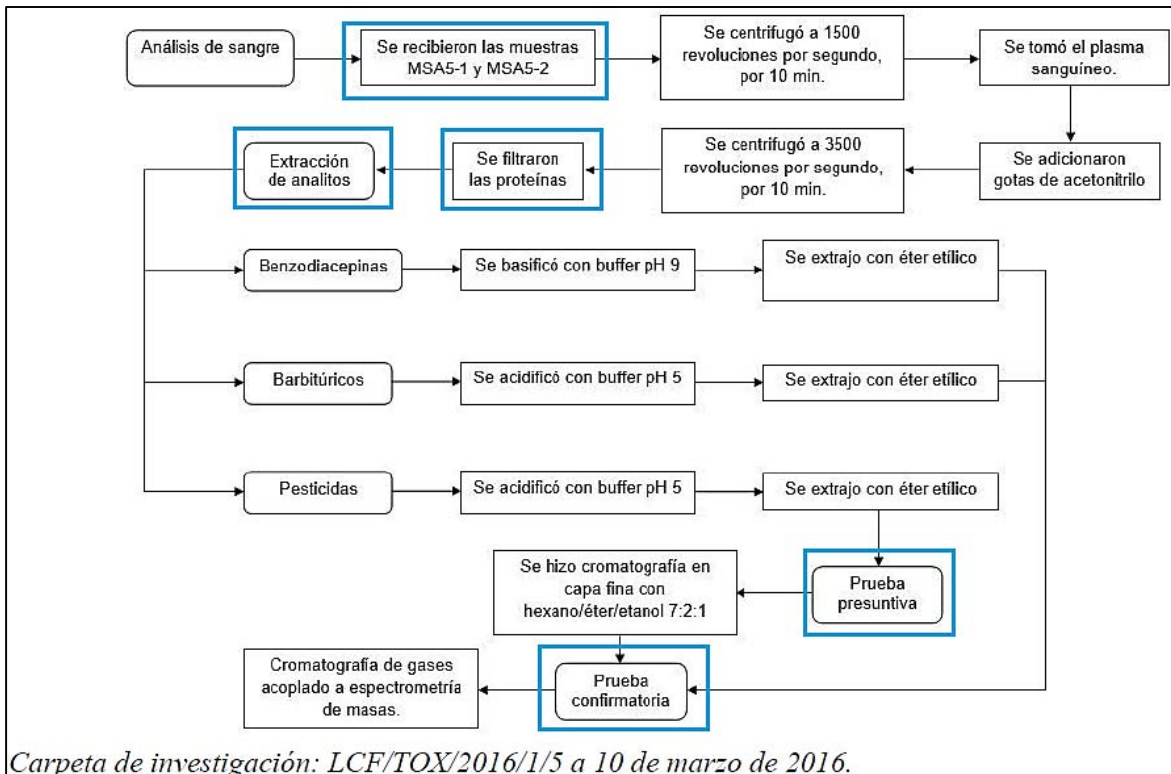


Ilustración 6. Fragmento de dictamen (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Diagrama de flujo para el análisis de sangre.

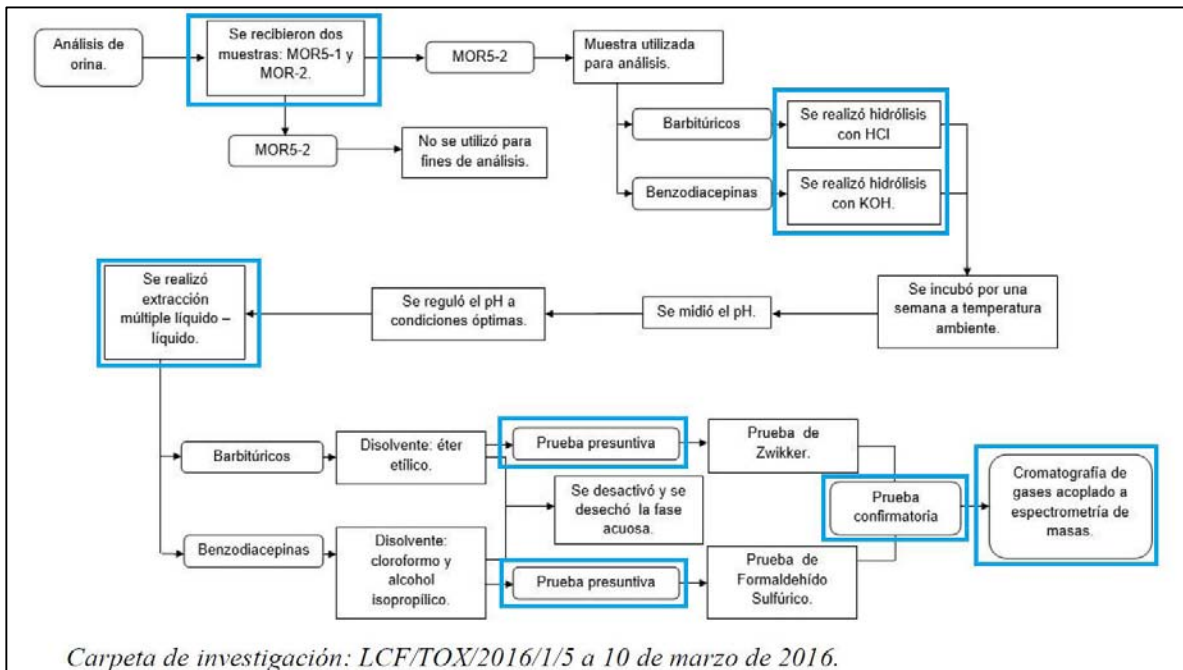


Ilustración 7. Fragmento de dictamen (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Diagrama de flujo para el análisis de orina.

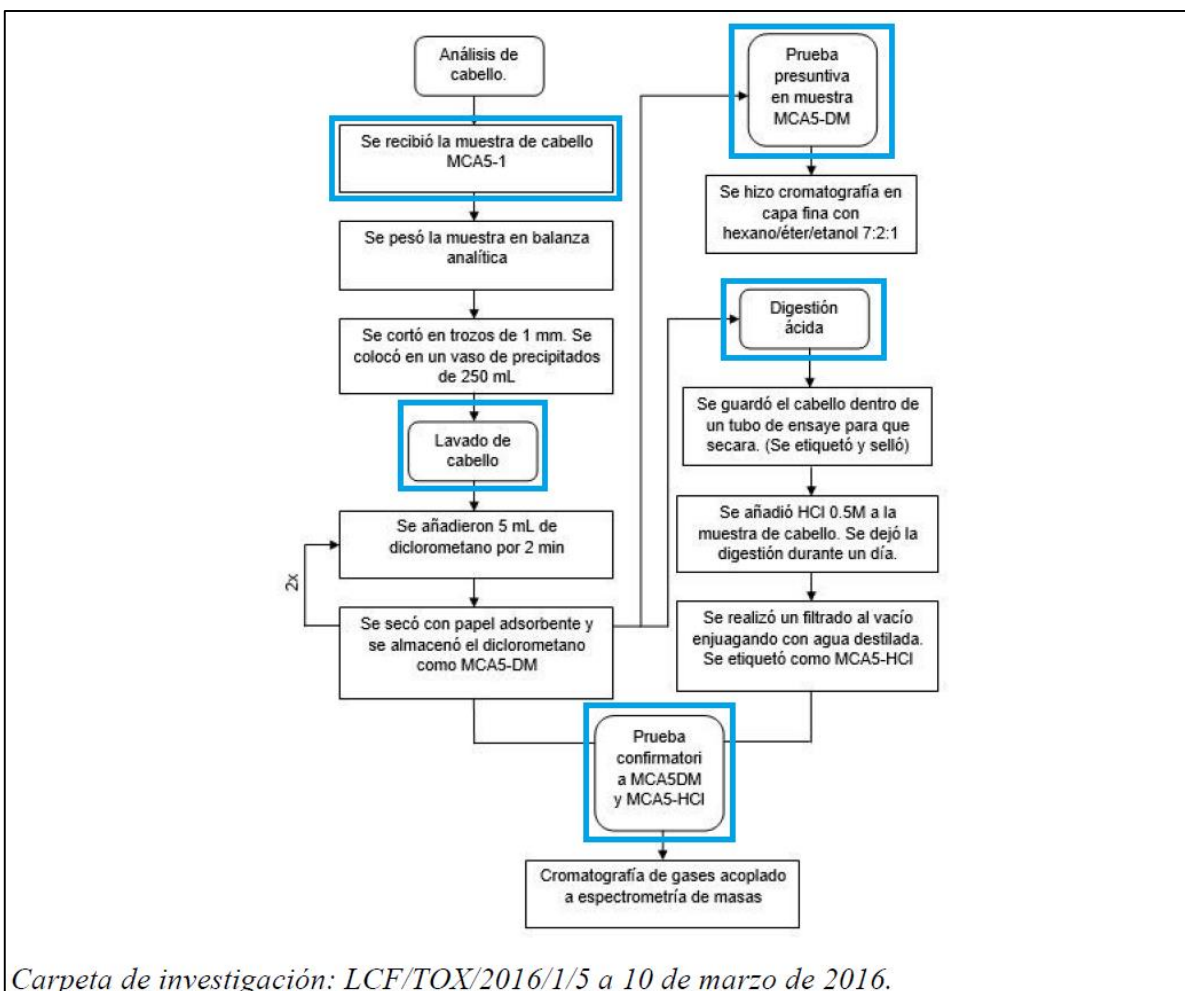


Ilustración 8. Fragmento de dictamen (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Diagrama de flujo para el análisis de cabello.

En la Ilustración 9 se observa como los alumnos, además de lograr una apropiación de conceptos y conocimientos, también desarrollan las competencias requeridas, por ejemplo, el pensamiento crítico y el liderazgo para tomar decisiones con respecto a su desempeño dentro del laboratorio. Dicha toma de decisiones se ve reforzada con bases científicas y la capacidad para defender sus ideas ya que plasman una justificación del motivo por el que diseñaron de esa forma su plan de análisis.

Contrario a los modelos educativos tradicionales, el pensamiento crítico, el liderazgo y la actuación con bases científicas, le permite al alumno alcanzar una maduración intelectual que los ayuda a encontrar soluciones a pequeñas

problemáticas que surgen fuera de la idealidad de situaciones que se viven en las aulas académicas.

CONSIDERACIONES TÉCNICO-CIENTÍFICAS

Por las condiciones en las que se nos entregaron las muestras de sangre, después de realizar la homogeneización, se consideró que no era necesario llevar a cabo la hidrólisis ya que esta matriz biológica es usar para buscar xenobióticos sin biotransformar. La desproteínización no se hizo debido a que después de la centrifugación para precipitar las proteínas, se observó que había presencia de hemólisis. Esto quiere decir que hubo rompimiento de las paredes celulares de los eritrocitos, por lo tanto, el contenido de las células se encontraban ya dispersas en toda la solución.

Debido a esta observación, se decidió hacer la extracción líquido-líquido con todo el tejido sanguíneo. Esto no supone un impedimento en la extracción líquido-líquido, ya que la naturaleza de los carbamatos es lipofílica y soluble en solventes orgánicos, mientras que el tejido sanguíneo es prácticamente acuoso, siendo así una inmiscibilidad ya inherente.

5

LCF/TOX/2016/3-1

La orina al ser la matriz biológica predilecta para hallar metabolitos por ser una de las principales vías de eliminación, se requiere el paso de hidrolización para poder disminuir la polaridad de los metabolitos a través de la ruptura de las conjugaciones, y así, aislarlos de la orina para facilitar la extracción. El uso de ácido clorhídrico puede llegar a la destrucción de compuestos sensibles a condiciones ácidas; pero ya que los carbamatos al ser estables en este tipo de condiciones los hacen viables para la hidrólisis mediante el uso de ácido clorhídrico. Para favorecer la ruptura de los enlaces, es importante el tiempo empleado en la incubación de la muestra a altas temperaturas, obteniéndose así buenos rendimientos.

En cromatografía en capa fina, los factores a tomar en cuenta serían la naturaleza de los eluyentes que se planean utilizar; el poder eluyente está en relación con la solubilidad de los

Ilustración 9. Fragmento de dictamen (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Se observa el apropiamiento de conocimientos y el desarrollo de algunas competencias.

RESULTADOS

Pruebas Presuntivas

Al aplicar la prueba del yoduro de potasio en la digestión en agua regia de las 3 partes del cabello, se obtuvo positivo para plomo en todas ellas. La parte media fue la que obtuvo mayor cantidad de precipitado dorado. En la digestión en HCl 1M intentada se obtuvo un color amarillo muy tenue. Por otro lado, la prueba en el lavado de cabello en diclorometano resultó negativa (Fotografías Véase Anexo 6). Al aplicar la prueba de yoduro de potasio en el suero de la sangre, solo se logró ver un precipitado de color café y no color amarillo como se esperaría para plomo.

Anexo 6. Prueba presuntiva de yoduro de potasio (KI), para la identificación de plomo.

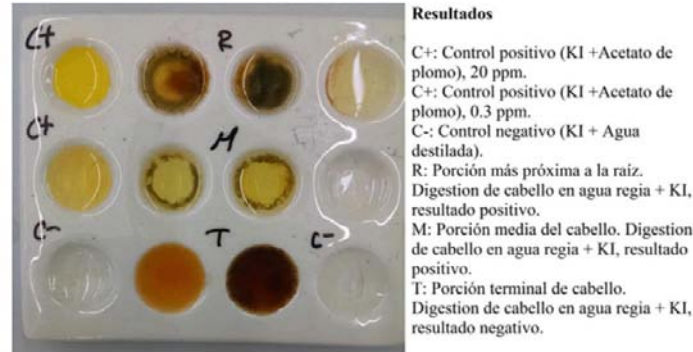
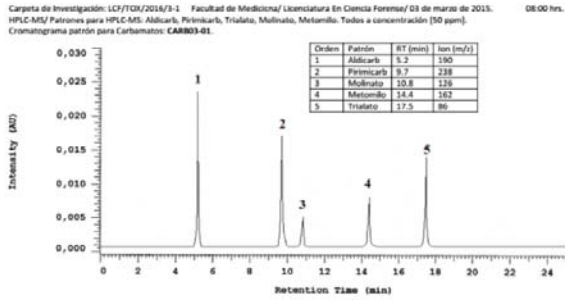


Ilustración 10. Fragmento de dictamen (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Se observa el resultado de pruebas presuntivas para la presencia de plomo.

En las Ilustración 10 y 11 se observan los resultados para las pruebas presuntivas y de confirmación que realizaron los alumnos. A su vez realizaron los análisis de resultados pertinentes que incluyen el empleo de las curvas de calibración, cálculos de concentración por estándar externo o interno y finalmente, con base en estos análisis, además de las consideraciones por los factores a considerar en la interpretación de los resultados, los alumnos pudieron llegar a conclusiones fundadas y de nueva cuenta, con un enfoque en la importancia no sólo de la toxicología como ciencia, sino como herramienta en la resolución de problemas en el contexto social de desarrollo del individuo.

Gráfica 1. Cromatograma patrón para carbamatos.

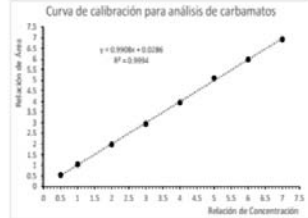


Gráfica 2. Patrón interno de trialato/estándar de metomilo.

Carpeta de Investigación: LCF/TOX/2016/3-1 Facultad de Medicina/ Licenciatura En Ciencia Forense/ 03 de marzo de 2015. 09:30 hrs.
 HPLC-MS/ Curva de Calibración/ Patrón Interno: Trialato/ Soluciones Estándar: Metomilo.

Concentración del Estándar (mg/L)	Concentración del Patrón Interno (mg/L)	Área del Estándar	Área del Patrón Interno	Relación de Concentraciones (Cm/Ce)	Relación de Áreas (Am/Ai)
25	50	39000	71700	0.5	0.543933054
50	50	75000	72000	1	1.041666667
100	50	142500	71000	2	1.978873239
150	50	219500	74500	3	2.946308723
200	50	306000	77500	4	3.948387097
250	50	383000	75500	5	5.099337748
300	50	429000	71200	6	5.981606067
350	50	500000	72200	7	6.925207756
MSA3-21	50	386500*	79300	DESCONOCIDA	4.924337997
MSA3-11	50	385000**	79500	DESCONOCIDA	4.904485599

*Representa en área bajo la curva de la muestra MSA3-21 ** Representa el área de la muestra MSA3-11



Gráfica 3. Resultados para la muestra MSA3-21 para carbamatos en sangre.

Carpeta de Investigación: LCF/TOX/2016/3-1 Facultad de Medicina/ Licenciatura En Ciencia Forense/ 03 de marzo de 2015. 08:30 hrs.
 HPLC-MS/ Patrón Interno: Trialato/ MSA3-21. Presunción de Carbamatos/Metomilo.
 Cromatograma **REM5A3-21A**

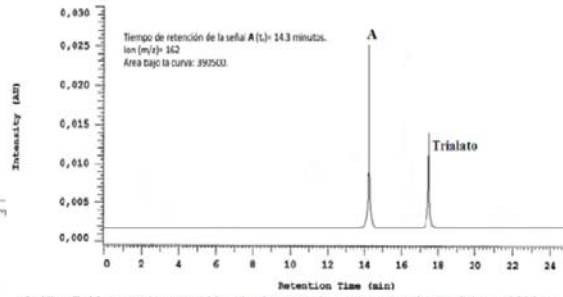


Gráfico 7. Muestra de contenido gástrico con altas concentraciones del xenobiotico.

Carpeta de Investigación: LCF/TOX/2016/3-1 Facultad de Medicina/ Licenciatura En Ciencia Forense/ 03 de marzo de 2015. 11:00 hrs.
 HPLC-MS/ Patrón Interno: Trialato/ MCG3-11 (Contenido Gástrico): Presunción de Carbamatos/Metomilo.
 Cromatograma **REMCG3-11C**

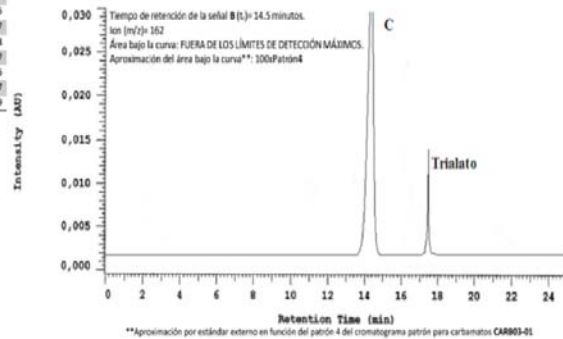


Ilustración 11. Fragmento de dictamen (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Se observa el resultado de pruebas de confirmación para la presencia de carbamatos.

En la Ilustración 12 se muestran, a manera de ejemplo, las conclusiones que obtuvieron dos de los equipos de laboratorio al finalizar su ejercicio de recapitulación global.

Finalmente, en las Ilustración 13, 14 y 15 se muestran el índice de una bitácora, la lista de cotejo para el control del registro de cadena de custodia y la resolución de uno de los ejercicios prácticos incluidos en la presente propuesta de manual.

CONCLUSIONES

Las pruebas confirmatorias realizadas dan como resultado la presencia de plomo a cantidades mayores al límite máximo permisible de exposición en todas las muestras biológicas tomadas del Sr. Juan Cuesta. De igual manera, se descarta la presencia de sustancias de abuso en su organismo.

De acuerdo a los resultados obtenidos y los cálculos realizados:

PRIMERA: El Sr. Juan Cuesta no muestra rastros de haber consumido una sustancia de abuso recientemente.

SEGUNDA: El Sr. Juan Cuesta sí presenta concentraciones plasmáticas de plomo referentes a los síntomas presentados.

TERCERA: No se encontraron sustancias de abuso en ninguna de las muestras.

CUARTA: El Sr. Juan Cuesta presenta plomo incorporado a su cabello desde hace mínimo 10 meses, indicando una intoxicación crónica.

QUINTA: Si se presenta una intoxicación por el metal pesado plomo, encontrado en las muestras de sangre, cabello y orina.

SEXTA: Las concentraciones en sangre, cabello y orina son: 221.76ppm (sangre), 278.90ppm (cabello) y 40.80ppm (orina).

Con el uso de esta fórmula es de donde se obtienen las siguientes concentraciones:

- Muestra de sangre (M5A3-11): 246 mg/L
- Muestra de sangre (M5A3-21): 247 mg/L
- Muestra de contenido gástrico: Área bajo la curva se encuentra fuera de los límites, por lo tanto no es posible calcular la concentración de forma analítica. El mismo cromatograma nos indica que la aproximación sería 100 veces la concentración del estándar número 4 correspondiente a metomilo. Siendo la concentración del estándar de metomilo de 50 ppm, multiplicado por 100, daría 5000 mg/L (valor aproximado).
- Muestras de orina sin presencia de metomilo.

CONCLUSIONES

Después de haber realizado las cromatografías en capa fina para las pruebas presuntivas y las cromatografías de líquidos para que nuestros resultados en las pruebas presuntivas fueran confirmados. Las muestras presentadas contenían metomilo de la familia de los carbamatos, que es el xenobiótico de interés que se buscó con base en la sintomatología presentada por el señor Ricardo Carrillo Medina. Con base en lo antes expuesto, se formulan las siguientes:

PRIMERA: Las 2 (dos) muestras de sangre antes enumeradas y descritas, dieron positivo a la presencia de metomilo, con la concentración suficiente para causar la muerte.

SEGUNDA: Las 2 (dos) muestras de orina antes enumeradas y descritas, dieron negativo a la presencia de metomilo, debido a la exposición del pesticida y éste no se alcanzó a metabolizar.

TERCERA: La muestra de contenido gástrico antes numerada y descrita, dio positivo a la presencia de metomilo en altas concentraciones ya que la exposición al xenobiótico fue oral, causando la muerte del señor Ricardo Carrillo Medina.

Ilustración 12. Fragmento de dictamen (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Se observan las conclusiones elaboradas por dos equipos de laboratorio.

ÍNDICE

a
Práctica 7

• Práctica 1. Recolección de muestras	5
• Práctica 2. Preparación de muestras	13
• Práctica 3. Pruebas de orientación	23
o presuntivas	
• Recolección de muestras	5
- Ejercicio práctico 1	5
- Ejercicio práctico 2	7
- Ejercicio práctico 3	8
- Recepción de muestras	10
• Preparación de muestras	13
- Ejercicio práctico 4	15
- Notas	21
- Manejo de residuos	22
- Conclusiones	22
• Pruebas de orientación o presuntivas	23
- Procedimientos	24
- Ejercicio práctico 5	27
- Notas	29
- Resultados	30
- Discusión	31
- Conclusiones	32
- Manejo de residuos	32
• Pruebas de confirmación	33
- Ejercicio práctico 6	33
- Solicitud de análisis	35
- Resultados	37
- Discusión	43
- Conclusiones	47
- Ejercicio práctico 7	47
• Disposición final de residuos	50
- Notas	51
- Conclusiones	51

Ilustración 13. Fragmento de bitácora (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Se observa el índice que detalla el trabajo elaborado a lo largo del curso de laboratorio de toxicología.

LISTA DE COTEJO

	04-feb		11-feb		18-feb		25-feb		03-mar		10-mar		17-mar	
	SI	No	SI	No	SI	No	SI	No	SI	No	SI	No	SI	No
1 El RCC está completamente lleno y las partes en blanco canceladas	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
2 La carpeta de investigación corresponde a la solicitud y es el mismo que en el RCC y en el indicio	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
3 La identificación del indicio en el RCC y el del embalaje es el mismo	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
4 Todos las hojas del RCC son entregadas y vienen juntas	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
5 El tipo de embalaje y material descrito en el RCC es el mismo al entregado	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
6 La identidad de la persona que entrega, corresponde con el RCC	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
7 La hora de entrega-recepción concuerda con el RCC	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
8 Los indicios corresponden a la descripción	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
9 Se indican las condiciones óptimas de preservación de los indicios	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
10 Los indicios se entregan bajo las condiciones óptimas de traslado y/o almacenaje	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
11 El último sello en el embalaje está intacto sin intento de transgresión	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
12 Los sellos contienen al menos una firma o rubrica de las autoridades involucradas en el proceso.	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
13 El volumen de la muestra es el mismo que el indicado en las observaciones de la sesión anterior	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
14 El RCC muestra continuidad, trazabilidad y se incluyen observaciones	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
Observaciones 04 de febrero	No hay continuidad y trazabilidad, el RCC está mal llenado.													
Observaciones 11 de febrero	Resguardo adecuado de indicios													
Observaciones 18 de febrero	Al momento de solicitar las muestras estas habían sido entregadas a otro.													
Observaciones 25 de febrero	Resguardo adecuado de indicios													
Observaciones 03 de marzo	Resguardo adecuado de indicios.													
Observaciones 10 de marzo														
Observaciones 17 de marzo														

Ilustración 14. Fragmento de bitácora (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Se observa la lista de cotejo que les permite llevar un seguimiento, adicional al RCC, sobre las muestras a analizar.

$\text{NaCN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCN} + \text{Na}_2\text{CO}_3$ *De ácido cianhídrico*

CONCLUSIONES

- No hay presencia de plaguicidas en ninguna de nuestras muestras.
- Se presume de la presencia de ácido cianhídrico debido al análisis de resultados realizado.
- No es posible cuantificar la cantidad de xenobiótico debido a la falta de un patrón o curva estándar de cianuro.
- Para dictaminar sobre nuestros resultados, será necesario realizar al menos una prueba presuntiva para cianuro, así como obtener una curva para cuantificar por GC/MS.

QUESTIONARIO (Ejercicio práctico 7)

- ¿Qué información sobre el caso debe considerarse?
Inicialmente los síntomas presentados por el occiso, y su causa de muerte para así poder cotejar con un marco teórico cuáles son las posibles sustancias que se pueden encontrar, además es necesario conocer las características de estas posibles sustancias para dirigir la investigación.
- ¿Qué información sobre el individuo debe considerarse?
Su salud física tiempo antes de la muerte y del inicio de los síntomas; su peso para poder determinar si los concentraciones halladas podrían ocasionar la muerte de acuerdo a la D50. Así como su trabajo, para considerar las posibles fuentes de exposición; y finalmente sus hábitos alimenticios ya que si estamos hablando de la presencia de cianuro es importante conocer si comía semillas de frutos o almendras que contienen cianuro en pequeñas cantidades.

47

3. ¿Qué aspectos sobre el muestreo debería considerarse?
El tipo de muestra obtenida y las características con la que se nos entregan, así como su cantidad para poder determinar que análisis se podrán realizar en función del volumen de muestra recibido.
Que las matrices biológicas obtenidas tengan las condiciones o sean ideales para la detección de la sustancia de interés de acuerdo a la toxicocinética del mismo.

4. Complete la siguiente información para cada xenobiótico encontrado.

Sustancia: <u>Acido cianhídrico</u>	
Propiedades fisicoquímicas:	LogP: <u>—</u> hidrosoluble pKa: <u>9.21</u>
Parámetros farmacocinéticos:	T _{1/2} : <u>0.8-1.3</u> horas
Vía de administración: <u>oral</u>	Unión a proteínas
Vía de eliminación: <u>respiratoria, renal</u>	Vd: <u>—</u> Metabolitos: <u>tiocianato</u>
Información toxicológica:	Dosis letal media: <u>1.52 mg/kg</u> Dosis terapéutica: <u>—</u> Efectos tóxicos relevantes: <u>agitación, mareos, náuseas, vómito, confusión.</u>
Matrices en las que se encontró (indique la concentración) No se pudo calcular concentración	Sustancia sin alterar
	Metabolito
Sangre: <input checked="" type="checkbox"/>	Sangre: <input checked="" type="checkbox"/>
Orina: <input checked="" type="checkbox"/>	Orina: <input checked="" type="checkbox"/>
Cabello: <input checked="" type="checkbox"/>	Cabello: <input checked="" type="checkbox"/>
Contenido gástrico: <input checked="" type="checkbox"/>	Contenido gástrico: <input checked="" type="checkbox"/>
Otra (indique): <input checked="" type="checkbox"/>	Otra (indique): <input checked="" type="checkbox"/>

5. En los casos donde aplique, calcule el cociente [Sustancia/Metabolito]
NO APLICA

6. Comente sobre los resultados obtenidos en el análisis de cada matriz y su relación con la temporalidad de la exposición o consumo de la sustancia.

48

Como se mencionó antes, es muy probable que el consumo de la sustancia haya ocurrido pocas horas antes de la muerte, debido a que se encontró una mayor cantidad de xenobiótico en el contenido gástrico (MCA3-1); seguida de esta se encontró mayor cantidad en sangre (MSA3-2) que en orina (MO23-1).
Indica un consumo oral reciente, donde el individuo sólo logra eliminar poca cantidad del xenobiótico sin biotransformar a través de la vía renal.

7. Comente sobre los resultados cuantitativos obtenidos en el análisis de cada matriz y su relación con un posible abuso de sustancia o dosificación letal.
NO APLICA.

49

Ilustración 15. Fragmento de bitácora (Alumnos de la 2a generación. LCF 2016-II). Se observa la resolución del ejercicio práctico No.7 de la propuesta de manual de laboratorio.

6. Conclusiones.

En concordancia con los objetivos de la presente tesis, se logró diseñar y elaborar un manual práctico que pone a disposición de los alumnos de la LCF, un compendio de la información más relevante e indispensable de ésta área, que los guía en la aplicación de esta información a través de la resolución de una situación problemática o ejercicio de investigación dirigida.

A lo largo de su estructura se puede encontrar información relevante sobre:

- Las matrices biológicas de mayor empleo en los análisis toxicológicos.
- Información sobre la toma y conservación de muestras biológicas.
- Información relacionada con el tratamiento de muestras.
- Posibles pruebas presuntivas y de confirmación.
- Propuestas para la cuantificación de xenobióticos.
- Características particulares de xenobióticos de interés legal.
- Consideraciones en la interpretación de resultados.
- Situaciones problemáticas por resolver.

Con la ayuda del manual como material didáctico para el laboratorio, se logró introducir a los alumnos en el área de la toxicología forense permitiéndoles tener una referencia sobre la aplicación de esta disciplina dentro del contexto jurídico de la actualidad.

Se elaboraron cuestionarios que fomentaron en los estudiantes la aplicación de la información proporcionada y el desarrollo de competencias como:

- La actuación con bases científicas y el desarrollo del pensamiento crítico.
- La elaboración de planes de análisis.
- Trabajo en equipo y ejercicio de liderazgo.
- La capacidad de recabar material sensible significativo.
- Procesamiento de los indicios.

- Ejercicios de recapitulación periódica.
- Integración de información y emisión de dictámenes.

De forma paralela, se crearon rúbricas para evaluar el trabajo de los estudiantes en la elaboración tanto de la bitácora, como del dictamen que permitieron al mismo tiempo, una estandarización de conocimientos como consecuencia de la creación o modificación de conceptos a partir de la información básica contenida en el manual y de los conocimientos previos de otras materias como química general, química orgánica, química forense, entre otras.

Se logró promover en los alumnos la aplicación de conocimientos previos sobre diversas estrategias, metodologías y técnicas analíticas empleadas para la extracción, identificación, cuantificación e interpretación de diferentes xenobióticos de interés legal.

De manera similar, se promovió en los alumnos la elaboración o diseño de planes de análisis de muestras biológicas para el desarrollo de pruebas toxicológicas.

Finalmente, el empleo de la estrategia de enseñanza-aprendizaje conocida como Investigación Dirigida permitió obtener un manual con un enfoque innovador que incentiva, de acuerdo a lo pretendido por el plan de estudios de la LCF, un aprendizaje basado en competencias donde el alumno es el principal creador de su aprendizaje.

7. Bibliografía.

- [1] J. Núñez J., “Lo que la Educación Científica no Debería Olvidar: Rigor, Objetividad y Responsabilidad Social,” *La ciencia y la tecnología como procesos sociales. Lo que la educación científica no debería olvidar.*, 2000. .
- [2] A. Lancelle, “La Investigación Dirigida como Estrategia Didáctica en la Formación de Profesores de Biología,” *Rev. Estud. en Ciencias Humanas. Estud. y Monogr. los Postgrados.*, no. 9, pp. 1–11, 2010.
- [3] J. Martínez Torregrosa, J. L. Domènech Blanco, A. Menargues, and G. Romo Guadarrama, “La integración de los trabajos prácticos en la enseñanza de la química como investigación dirigida,” *Educ. Quim.*, vol. 23, no. 1, pp. 112–126, 2012.
- [4] M. I. Torres S., “La Enseñanza Tradicional de las Ciencias Versus las Nuevas Tendencias Educativas,” *Rev. Electrónica Educ.*, vol. XIV, no. 1, pp. 131–142, 2010.
- [5] J. I. Pozo and C. Monereo, *El Aprendizaje Estratégico. Enseñar a Aprender Desde el Currículo*. Madrid, España: Santillana/Aula XXI, 1999.
- [6] E. Morin, *Los siete Saberes Necesarios para la Educación del Futuro*. Barcelona, España: Editorial Paidós, 2001.
- [7] J. M. Miyahira A., “La investigación formativa y la formación para la investigación en el pregrado,” *Rev. Médica Hered.*, vol. 20, no. 3, pp. 119–122, 2009.
- [8] A. Villa and M. Poblete, *Aprendizaje Basado En Competencias. Una propuesta para la evaluación de las competencias genéricas*. Bilbao, Universidad de Deusto: Ediciones Mensajero, S. A. U., 2007.
- [9] J. Pozo and M. Gómez, *Aprender y enseñar ciencia: Del conocimiento cotidiano al conocimiento científico*. Madrid, España: Ediciones Morata, 1998.
- [10] C. Alfonso, “Familiarización de los estudiantes con la actividad científica investigadora: Método dinámico para caracterizar el movimiento de traslación de un cuerpo,” *Enseñanza las Ciencias*, vol. 3, no. 1, pp. 1–13, 2004.

- [11] O. Zarza C., "Aprendizaje por descubrimiento," *Innovación y Exp. Educ.*, vol. 45, no. 6, pp. 1–10, 2009.
- [12] A. Garritz, "Indagación: las habilidades para desarrollarla y promover el aprendizaje," *Educ. Quim.*, vol. 21, no. 2, pp. 190–197, 2010.
- [13] G. Gellon, E. Rosenvasser Feher, M. Furman, and D. Golomberck, *La Ciencia en el Aula. Lo que nos Dice la Ciencia de Cómo Enseñarla*. Paidós. Buenos Aires, 2005.
- [14] F. J. Diego-Rasill, *El método científico como recurso pedagógico en el bachillerato: Haciendo ciencia en clase de biología*. Pulso, 2004.
- [15] O. F. Ruíz, "Modelos didácticos para la enseñanza de las ciencias naturales," *Rev. Latinoam. Estud. Educ.*, vol. 3, no. 2, pp. 41–60, 2007.
- [16] D. Gil, J. Martínez T., and B. Martínez S., "La Universidad como nivel privilegiado para un aprendizaje como investigación orientada," in *La Universidad Ante la Nueva Cultura Educativa: Enseñar y Aprender para la Autonomía*, no. April, C. Monero and J. I. Pozo, Eds. 2003, pp. 231–244.
- [17] A. Mora Z., "La investigación dirigida," *VII Congreso Nacional de Ciencias. Exploraciones Fuera y Dentro del Aula*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica, pp. 1–12, 2005.
- [18] M. Míguez, "Una Estrategia Didáctica Alternativa en Aulas Universitarias de Química: Potenciando el Proceso Motivacional por el Aprendizaje," *Educ. Química*, vol. 21, no. 4, pp. 278–286, 2010.
- [19] M. de la C. Medina R., "Una Propuesta de Enseñanza Basada en la Investigación Dirigida del Tema de Transmisión de Calor para Estudiantes de Bachillerato," Instituto Politécnico Nacional, 2011.
- [20] U. N. I. Drug, "Recommended Methods for the Detection and Assay of Lysergide (LSD), Phencyclidine (PCP), Psilocybin and Methaqualone in Biological Specimens," p. 60, 1999.
- [21] L. Felipe and B. Estrada, "Acuerdo A/078/12 de la P.G.R. por el que se establecen la directrices que deberán observar los servidores públicos para la debida preservación y procesamiento del lugar de los hechos o del hallazgo y de los indicios, huellas o vestigios del hecho delictuo," pp. 1–14, 2015.

- [22] I. de D. y R. Epidemiológica, *Manual para la Toma, Envío y Recepción de Muestras para Diagnóstico.*, PRIMERA ED. Ciudad de México: © INDRE-DGE-SECRETARÍA DE SALUD, 2014.
- [23] United Nations International Drug Control Programme, *Guidelines for Testing Drugs under International Control in Hair, Sweat and Saliva*. New York: United Nations, 2014.
- [24] M. J. N. Borge, "Tema 3. Secreción salivar y gástrica.," 2011. .
- [25] U. Departamento de Biología Celular y Tisular. Facultad de Medicina., "Repaso Teórico Biología Celular e Histología Médica 2ª Unidad Temática," p. 97, 2012.
- [26] L. Fondebrider and M. C. Mendonça, "Protocolo modelo para la investigación forense de muertes sospechosas de haberse producido por violación de los derechos humanos," p. 86, 2001.
- [27] U. N. I. D. C. Programme, "Guidelines for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts," p. 45, 2011.
- [28] United Nations International Drug Control Programme, *Recommended Methods for the Detection and Assay of Barbiturates and Benzodiazepines in Biological Specimens*. New York: United Nations, 1997.
- [29] D. J. S. Mejía, "¿Cómo se termina el efecto de los fármacos?" Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México, 2010.
- [30] B. et al. Levine, *Principles of Forensic Toxicology*, Third Edit. Whashington D.C: AACC Press, 2009.
- [31] A. E. Donaldson and I. L. Lamont, "Biochemistry Changes That Occur after Death: Potential Markers for Determining Post-Mortem Interval," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e82011, 2013.
- [32] A. Santos, D. Sen, I. Belda, A. Luis, G. Pozuelo, A. Alonso, C. Domingo, and M. Díaz, "Microbiología forense," *Reduca (Biología). Ser. Microbiol.*, vol. 5, no. 5, pp. 23–45, 2012.
- [33] Clarke, *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*, Second Edi. London: Pharmaceutical Press, 2013.
- [34] F. Gennesser, "Aparato digestivo," *Histología*, pp. 465–534, 2000.

- [35] E. V. Contreras, "Los ácidos biliares," *Instituto de Química. UNAM*, 2003. .
- [36] T. U. O. C. Medicine, "Hígado: Anatomía y Funciones," 2015. .
- [37] R. et al. Vanbinst, "Bile analysis of drugs in post-mortem cases," *Forensic Sci. Int.*, vol. 128, pp. 35–40, 2002.
- [38] a. Ortega Pérez, "¿Estaba intoxicado por cocaína este individuo? (I): estimaciones basadas en la farmacocinética de la droga," *Cuad. Med. Forense*, no. 33, pp. 5–12, 2003.
- [39] C. Pascuzzo, *Farmacología Básica*. 2008.
- [40] R. Getty, "Sistema Digestivo," *Anat. dos animais domésticos*, pp. 1–17, 1981.
- [41] J. Perea and J. Subirats, "La digestión," in *Biología. ESO*, Casals, 2005, p. 16.
- [42] J. Joseph Fenton, *Toxicology. A case-oriented approach*. New York: LLC, CRC Press, 2002.
- [43] J. T. Mosquera and M. C. Menéndez, "Alcohol etílico: Un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado," *Rev. Fac. Med. Univ. Nac. Colomb.*, vol. 54, pp. 32–47, 2006.
- [44] H. Cl, B. Enviar, and B. Oliver, "Toxicología del cannabis," *Adicciones*, vol. 12, no. 2, pp. 169–174, 2000.
- [45] P. C. Favaro, *Metrology of Nail Clippings as Trace Element Biomarkers*. NETHERLANDS: IOS Press, 2013.
- [46] I. Rodushkin and M. D. Axelsson, "Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden," *Sci Total Env.*, vol. 262, no. 21, 2000.
- [47] S. Suzuki and T. Inoue, "Analysis of Methamphetamine in Hair, Nail, Sweat, and Saliva by Mass Fragmentography," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 13, pp. 176–178, 1989.
- [48] K. Arwa, M. Nadia, A. Adnene, H. Zouheir, and M. Samir, "Application of Victim's Fingernails in Forensic DNA Analysis," *J. Indian Acad. Forensic Med.*, vol. 32, no. 4, pp. 971–973, 2007.
- [49] a Fernández-Rodríguez, M. . Iturralde, L. Fernández de Simón, J. Capilla,

- and M. Sancho, "Genetic analysis of fingernail debris: application to forensic casework," *Int. Congr. Ser.*, vol. 1239, pp. 921–924, 2003.
- [50] E. M. a Ali, H. G. M. Edwards, M. D. Hargreaves, and I. J. Scowen, "Detection of explosives on human nail using confocal Raman microscopy," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 40, no. November 2008, pp. 144–149, 2009.
- [51] O. A. Locani, M. J. Ramírez, M. L. Santos, and A. Silva, *Toxicología Forense*, First Edit. Argentina: Dosyuna Ediciones Argentinas, 2009.
- [52] Committe of Systematic Toxicological Analysis, "Recommendations on Sample Collection," *Int. Assoc. Forensic Toxicol.*, vol. XXIX, no. 1, pp. 1–7, 2008.
- [53] PGR, *ACUERDO A/009/15 Por el que se establecen las directrices que deberán observar los servidores públicos que intervengan en materia de cadena de custodia*. México: Diario Oficial de la Federación, 2015, pp. 1–19.
- [54] Secretaría de Gobernación, Procuraduría General de la República, and Consejo de Coordinación para la Implementación del Sistema de Justicia Penal, "Guía Nacional de Cadena de Custodia." Conferencias Nacionales Conjuntas de Procuración de Justicia y de Secretarios de Seguridad Pública, México, p. 42, 2015.
- [55] E. D. Álvarez-Guerra, H. G. Parkes, and J. D. Bell, "Estudio comparado de dos métodos de desproteínización para la evaluación de sangre total y plasma mediante espectroscopia de resonancia magnética," *Bioquímica*, vol. 31, no. 2, pp. 59–68, 2006.
- [56] A. R. Gennaro, *Remington. Farmacia. Volúmen 1.*, 20th ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A., 2003.
- [57] A. B. Pomilio and A. A. Vitale, "Técnicas para determinación cuali/cuantitativa de drogas de abuso en fluidos biológicos," *Acta bioquímica clínica Latinoam.*, vol. 40, no. 3, pp. 347–382, 2006.
- [58] Commite of Systematic Toxicological Analysis, "Recommendations on Sample Preparation of Biological Specimens for Systematic Toxicological Analysis," *Int. Assoc. Forensic Toxicol.*, vol. XLI, no. 2, pp. 1–10, 2012.
- [59] J. M. Macarulla and F. M. Goñi, *Bioquímica Humana: Curso Básico.*

Segunda Ed. Barcelona, España: Editorial Reverté, S.A., 1994.

- [60] T. Cairns, V. Hill, M. Schaffer, and W. Thistle, "Removing and Identifying Drug Contamination in the Analysis of Human Hair.," *Forensic Sci. Int.*, vol. 145, pp. 97–108, 2004.
- [61] L. Tsanaclis and J. F. Wicks, "Differentiation Between Drug Use and Environmental Contamination When Testing for Drug in Hair," *Forensic Sci. Int.*, vol. 176, pp. 19–22, 2008.
- [62] N. T. Lappas and C. M. Lappas, *Forensic Toxicology: Principles and Concepts*, First Edit. China: Shirley Decker-Lucke, 2016.
- [63] I. Papoutsis, P. Nikolaou, A. Dona, C. Pistos, M. Stefanidou, C. Spiliopoulou, and S. Athanaselis, "A validated GC–MS method for the determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in bile samples," *Forensic Toxicol.*, vol. 30, no. 1, pp. 51–58, 2012.
- [64] D. G. Barceloux, *Medical Toxicology of Drug Abuse: Synthesized Chemicals and Psychoactive Plants*. USA: Wiley, 2012.
- [65] Cheng and et al. Liang, "Identification and quantification of 34 drugs and toxic compounds in blood, urine, and gastric content using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Liquid Chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 30, no. 10, 2015.
- [66] UNAM, "Técnicas Cromatográficas," *Quim. Anal. Instrum. II*, pp. 1–123, 2007.
- [67] T. Michael, "Drugs Testing Book," *Basic Immunoassay Principles and Guidelines*, 2015. .
- [68] R. V Calderón, "Inmunoquímica," Cuernavaca, Morelos, 2007.
- [69] M. Repetto Jiménez and G. Repetto Kuhn, *Toxicología Fundamental*, Cuarta Edi. Sevilla, España: Diaz de Santos, 2009.
- [70] R. Ochoa, *Técnicas Inmunoenzimáticas Para Ensayos Clínicos de Vacunas y Estudios Inmunoepidemiológicos*, Primera Ed. La Habana, Cuba: Ediciones Finlay, 2012.
- [71] G. F. Biancucci and A. Strobl, *Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos Para Laboratorios de Baja Complejidad*. Argentina, 2007.
- [72] J. L. S. Martínez, "Instrumentacion y métodos de análisis químico,

- epectroscopia infrarroja I. Fundamentos.,” 2009.
- [73] L. C. Espinoza, “Utilización de espectroscopia infrarroja FTIR para la detección de microorganismos,” pp. 1–8, 2010.
- [74] U. de Alicante, “Servicios Técnicos de Investigación,” *ESPECTROSCOPIA INFRARROJA. Fundamentos*, 2015. .
- [75] E. González Tepalte, “Desarrollo de una Práctica Instrumental Integral. Análisis de Isoniazida por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia, Espectroscopía UV-Visible y Espectroscopía Infrarroja,” UNAM, 2013.
- [76] V. D. González Martínez, “Validacion de un metodo epectrofotometrico de UV/VIS pra determinar acido benzoico en bebidas de frutas,” UNAM, 1999.
- [77] M. J. Taberero Duque and A. M. Bermejo Barrera, “Interpretación de resultados en la investigación toxicológica de drogas de abuso.,” *Boletín Galego Med. Leg. e Forense*, no. 16, pp. 45–55, 2009.
- [78] L. P. Olgúin, H. Magadán, and M. Rodríguez, “Metodos en Biotecnología. Cromatografía de Gases.,” *Inst. Biotecnol.*, pp. 3–45, 2004.
- [79] E. Arribas Arbiol and F. Bandrés Moya, *Toxicología Clínica y Drogodependencias: Metadona*, Primera Ed. Madrid, España: Fundación Tejerina, Unidad Docente, 2009.
- [80] D. A. Skoog, F. J. Holler, and D. M. West, *Fundamentos de Química Analítica*, Cuarta Edi. Barcelona: Editorial Reverté, S.A., 2001.
- [81] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principios de Análisis Instrumental*, Sexta Edic. México: Editorial Cengage Learning, 2008.
- [82] E. Rocha Castro, “Espectrometría de absorción atómica,” *Fac. ciencias Quim.*, pp. 123–203, 2000.
- [83] M. I. Sánchez de Rojas, M. Pilar de Luxan, and M. Frias, “Inductively coupled plasma emission spectrometry,” *Mater. Construcción*, vol. 36, no. 202, pp. 31–46, 1986.
- [84] R. Arvizu, E. Valle, and A. Reyes, “Implementación del Método de Dilución Isotópica de Dos Etapas En La Medición de Cadmio y zinc en Tejido de Molusco,” *Simposio de Metrología*, no. 2. Querétaro, México, pp. 1–10, 2006.
- [85] R. García-Repetto, “Interpretación de resultados toxicológicos post-mórtem:

- critérios de garantía de calidad," *Rev. Española Med. Leg.*, vol. 41, no. 1, pp. 9–18, 2015.
- [86] F. Musshoff, U. M. Stamer, and B. Madea, "Pharmacogenetics and forensic toxicology," *Forensic Sci. Int.*, vol. 203, no. 1–3, pp. 53–62, 2010.
- [87] P. Alicot, A. Laure, and et al., "Mechanisms Underlying Postmortem Redistribution of Drugs: a review," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 27, pp. 533–544, 2003.
- [88] B. K. Logan and D. Smirnow, "Postmortem distribution and redistribution of morphine in man," *J Forensic Sci*, vol. 41, no. 2, pp. 221–229, 1996.
- [89] G. R. Jones and D. J. Pounder, "Site dependence of drug concentrations in postmortem blood—a case study," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 11, no. 5, pp. 186–190, 1987.
- [90] R. W. Prouty and W. H. Anderson, "A comparison of postmortem heart blood and femoral blood ethyl alcohol concentrations," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 11, no. 5, pp. 191–197, 1987.
- [91] V. M. Hargrove and J. R. McCutcheon, "Comparison of drug concentrations taken from clamped and unclamped femoral vessels.," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 32, no. 8, pp. 621–625, 2008.
- [92] M. Repetto and P. Sanz, *Glosario de Términos Toxicológicos. Recomendaciones de la IUPAC-1993. Versión Española Ampliada*. España, 1995.
- [93] R. Chang, *Química*, Décima Edi. Editorial McGraw-Hill, 2007.
- [94] R. A. Española, *Diccionario de la Lengua Española*, Vigésima E. España: Real Academia Española, 2014.