



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**VERIFICACIÓN DE LOS VALORES PARA DETERMINAR EL PUNTO
DE CORTE PARA LOS METABOLITOS DE MARIHUANA,
ANFETAMINAS, COCAÍNA Y DERIVADOS OPIÁCEOS EN ORINA
POR MEDIO DEL ANÁLISIS INMUNOENZIMÁTICO EN EL EQUIPO
EMIT VIVA “E”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA

LUIS ARTURO HERRERA RAMÍREZ

ASESOR

M. en F.B ELISA LÓPEZ LOEZA

CO-ASESOR

Q.F.B. JORGE GALILEO RUIZ JIMÉNEZ

Morelia Michoacán, Marzo del 2012



Revisores:

M.C. Gabino Estévez Delgado

M. en F.B. Blanca Nateras Marín

M.C. Lorena Cabrera Navarro.

I.Q. Jorge Pavel Victoria Tafoya.

M.C. Luz Elena Avalos León

Morelia Michoacán, Marzo del 2012

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud a dios y a todas las personas que de alguna manera, han hecho posible la realización de esta tesis, mediante su apoyo moral y colaboración. De manera especial a las siguientes personas:

A mi fantástica y única familia integrada por mi padre, Nicandro, mi madre, Eva y mi hermano Nicandro Jr, ya que con su apoyo he podido llevar a cabo el desarrollo de esta tesis, para ellos con mucho amor y cariño.

A mis abuelos y a toda mi familia, que me han apoyado en la realización de esta tesis.

A mis amigos y compañeros, a los cuales agradezco su apoyo y haberme brindado su amistad.

Al laboratorio de Química y Genética Forense de la PGJE por haberme permitido llevar a cabo las mediciones de esta tesis en sus instalaciones.

De manera especial a mi asesor y maestro Gabino Estévez Delgado por aceptarme en su grupo de tesis y que me apoyado de manera incondicional en la realización de la tesis.

A mis revisores por su tiempo dedicado a la revisión de mi tesis, su apoyo y consejos para mejorar la redacción de la misma.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por darme la oportunidad de formar parte de su matrícula y poder estudiar una carrera profesional.

A la facultad de Químico Farmacobiología por permitirme formarme en la carrera de Químico Farmacobiólogo.

ABREVIATURAS

Ab: Anticuerpo.

Ag: Antígeno.

AgF: Antígeno-Fluoresceína.

ANF: Anfetaminas.

APA: American Psychiatric Association.

CENAM: Centro Nacional de Metrología.

CG-MS: Cromatografía de Gases-Espectrofotometría de Masas.

COCA: Cocaína.

EIA: Inmunoensayo Enzimático.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

ema: Entidad Mexicana de Acreditación.

EURACHEM: Asociación Europea de Química Analítica, sigla en inglés de European Analytical Chemistry.

FPIA: Inmunoensayo de Polarización de Fluorescencia.

ISO: Organización Internacional para la Normalización.

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

NOM: Norma Oficial Mexicana.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPI: Opiáceos.

RIA: Radio Inmunoensayo.

SEDENA: Secretaría de la Defensa Nacional.

THC: Tetrahidrocannabinol.

σ : Precisión en condiciones de repetibilidad.

σ R: Precisión en condiciones de reproducibilidad.

RESUMEN

El consumo de drogas de abuso se ha convertido en un problema de salud pública: la marihuana, cocaína, anfetaminas y derivados del opio, son las drogas de mayor consumo en el estado con respecto a las demás. Para determinar si un individuo ha consumido dichas sustancias o no, el Laboratorio de Química Forense de la Procuraduría General del Estado de Michoacán realiza el método de inmunoensayo enzimático de tipo competitivo para realizar esta determinación, debido a que este es validado únicamente por el fabricante, surge la necesidad de realizar una Verificación por el usuario, para garantizar esta validez la cual se desarrolla de la siguiente manera comparando los resultados obtenidos con respecto a los valores conocidos y proporcionados por el fabricante, asegurando con ello que el método está trabajando de forma adecuada y brindar resultados válidos.

Para verificar el método cualitativo se aplican las pruebas de exactitud, precisión y veracidad, donde se comparan los resultados obtenidos por el fabricante contra los resultados obtenidos en el laboratorio de Química Forense.

Se realizó la Verificación con base en los valores obtenidos por el fabricante, estableciéndose las mejores características en cuanto a los parámetros de precisión se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad por medio de las cartas control y en el parámetro de veracidad se mide el error que se obtiene con respecto al fabricante. En conclusión el realizar esto, permitió establecer que el sistema está validado.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	i
Abreviaturas.....	iii
Resumen.....	iv

CAPÍTULO I INTRODUCCION

1.1 Introduccion.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	1
1.3 Planteamiento de la hipótesis.....	2
1.4 Variables.....	3
1.4.1 Variables dependientes.....	3
1.4.2 Variables independientes.....	3
1.5 Objetivos.....	3
1.5.1 Objetivo general.....	4
1.5.2 Objetivos específicos.....	4
1.6 Delimitación del tema.....	5

CAPÍTULO II ANTECEDENTES

2.1 Marco teórico.....	7
2.1.1 Drogadicción.....	8
2.1.2 ¿Qué es una droga?.....	9
2.1.3 Generalidades de las drogas de abuso para el estudio.....	9
2.1.3.1 Cannabis.....	10
2.1.3.1.1 Estructura química.....	10
2.1.3.1.2 Metabolitos.....	11
2.1.3.2 Cocaína.....	11
2.1.3.2.1 Estructura química.....	12
2.1.3.2.2 Metabolitos.....	12
2.1.3.3 Anfetaminas.....	12
2.1.3.3.1 Estructura química.....	13
2.1.3.3.2 Metabolitos.....	13
2.1.3.4 Derivados del opio.....	14
2.1.3.4.1 Estructura química.....	14
2.1.3.4.2 Metabolitos.....	14
2.1.4 Métodos de detección más comunes.....	15
2.1.4.1 Cromatografía.....	16
2.1.4.2 Inmunoturbidimetria.....	16
2.1.4.3. Radioinmunoensayo.....	16

2.1.4.4. Inmunoensayo de polarización de fluorescencia	17
2.1.4.5. Inmunoensayo enzimatico	17
2.1.4.5.1 Espectrofotometría	19
2.1.4.6 Métodos de confirmación: cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS).....	20
2.1.5 Validación de métodos	21
2.1.6 Objetivo de una validación	21
2.1.7 ¿Cuándo, por qué y quién realiza la validación de un método?	21
2.1.8 Importancia de la validacion.....	22
2.1.9 Técnicas de validación	23
2.1.10 Etapas de una validación	24
2.1.11 Tipos de validación.....	24
2.1.12 Tipos de validación en base a métodos cuantitativos, semi-cuantitativos y cualitativos.....	25
2.1.13 Métodos normalizados, normalizados modificados y no normalizados.....	26
2.1.14 Proceso de validación	26
2.1.15 Parámetros de validación.....	27
2.1.15.1 Veracidad.....	28
2.1.15.2 Precisión	28
2.1.15.3 Linealidad	29
2.1.16 Reglas para utilizar métodos validados	30
2.2 Marco juridico	31
2.2.1 Del reglamento de tránsito del estado de michoacán de ocampo	32
2.2.2 NMX-EC-17025-IMNC-2006	33
2.2.3 NMX-EC-15189-IMNC-2008.....	34
2.3 Marco histórico.....	35
2.3.1 Evolución en la elaboración de guías de validación.....	36
2.3.2 Validaciones para metabolitos de drogas de abuso	36

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Metodo y procedimiento.....	38
3.2 Reactivos	38
3.3 Materiales e instrumento	39
3.4 Preparación de muestras y procedimiento de la validacion.....	40
3.5 Procedimiento para Verificación	41
3.6 Análisis estadístico	42

CAPÍTULO IV PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Exactitud.....	45
4.1.1. Precisión	45
4.1.1.1 Repetibilidad.....	45
4.1.1.2 Reproducibilidad	48
4.1.2 Veracidad.....	51
4.1.2.1. Precisión en condiciones de repetibilidad	51
4.1.2.2 Precisión en condiciones de reproducibilidad.....	54
4.1.2.3 Prueba de diferencia crítica para la veracidad.....	57

CAPÍTULO V INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

5.1. Interpretacion de resultados para repetibilidad.....	61
5.2. Interpretacion de resultados para reproducibilidad	63
5.3. Conclusión de la prueba de precisión.....	64
5.4. Interpretación de los resultados para la linealidad de las mediciones provenientes de la repetibilidad.....	64
5.5. Interpretación de los resultados para la linealidad provenientes de las mediciones de la reproducibilidad.....	64
5.6. Interpretacion de los resultados para la veracidad.....	65

CAPÍTULO VI TRABAJO A FUTURO

6.1 Estudios propuestos que se pudieran derivar de esta investigación.....	66
Glosario de términos utilizados.....	68

ANEXOS

A1 Cartas control.....	72
A2 Prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS).....	73
Referencias bibliográficas	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1.1.1.1 Delta de absorbancia del calibrador/control nivel 3 para evaluar la repetibilidad de los metabolitos de las drogas de interés	46
Tabla 4.1.1.2.1 Delta de absorbancia del calibrador/control nivel 3 para evaluar la reproducibilidad de los metabolitos de las drogas de interés	48
Tabla 4.1.2.1.1 Delta de absorbancia para evaluar la linealidad para obtener la precisión en condiciones de repetibilidad	51
Tabla 4.1.2.1.2 Precisión en condiciones de repetibilidad	54
Tabla 4.1.2.2.1 Delta de absorbancia para evaluar la linealidad para obtener la precisión en condiciones de reproducibilidad	54
Tabla 4.1.2.2.2 Precisión en condiciones de reproducibilidad	57
Tabla 4.1.2.3.1. Valores de las medias obtenidas, valores provenientes del fabricante, la diferencia y la diferencia crítica.....	58

ÍNDICE DE GRÁFICAS Y FIGURAS

Figura 2.1.4.1.1.1 Δ^9 -tetrahidrocannabinol	10
Figura 2.1.4.1.2.1 11-nor- Δ^9 -Tetrahidrocannabinol 9-COOH.....	11
Figura 2.1.4.2.1.1 Benzoilmetilecgonina.....	12
Figura 2.1.4.2.2.1 Benzoilecgonina.....	12
Figura 2.1.4.3.1.1 Fenilisopropilamina	13
Figura 2.1.4.4.1.1 Diacetilmorfina	14
Figura 2.1.4.4.1.2 Morfina.....	15
Figura 3.3.1 EMIT Viva “E”	39
Figura 3.5.1 Procedimiento de la Verificación.....	41
Figura 4.1.1 Diagrama de Exactitud.....	45
Gráfica 4.1.1.1.1 Repetibilidad para Anfetaminas	46
Gráfica 4.1.1.1.2 Repetibilidad para metabolitos de Cocaína	47
Gráfica 4.1.1.1.3 Repetibilidad para Opiáceos.....	47
Gráfica 4.1.1.1.4 Repetibilidad para THC.....	48
Gráfica 4.1.1.2.1 Reproducibilidad para Anfetaminas	49
Gráfica 4.1.1.2.2 Reproducibilidad para metabolitos de Cocaína.....	49
Gráfica 4.1.1.2.3 Reproducibilidad para Opiáceos.....	50
Gráfica 4.1.1.2.4 Reproducibilidad para THC.....	50
Gráfica 4.1.2.1.1 Linealidad para Anfetaminas de la repetibilidad	52
Gráfica 4.1.2.1.2 Linealidad para Cocaína de la repetibilidad	52
Gráfica 4.1.2.1.3 Linealidad para Opiáceos de la repetibilidad	53
Gráfica 4.1.2.1.4 Linealidad para THC de la repetibilidad	53
Gráfica 4.1.2.2.1 Linealidad para Anfetaminas de la reproducibilidad.....	55
Gráfica 4.1.2.2.2 Linealidad para Cocaína de la reproducibilidad.....	55
Gráfica 4.1.2.2.3 Linealidad para Opiáceos de la reproducibilidad	56
Gráfica 4.1.2.2.4 Linealidad para THC de la reproducibilidad	56
Gráfica 4.1.2.3.1 Veracidad para Anfetaminas	59
Gráfica 4.1.2.3.2. Veracidad para Cocaína.....	59
Gráfica 4.1.2.3.3. Veracidad para Opiáceos.....	60
Gráfica 4.1.2.3.4. Veracidad para THC.....	60

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCION

En las últimas décadas, ha aumentado el uso de sustancias que alteran el comportamiento normal de los individuos, este incremento se observa principalmente en individuos que laboran bajo los influjos de alguna droga. Surge la necesidad de realizar estudios para comprobar la presencia o ausencia de alguna sustancia psicotrópica. El consumo de estas sustancias puede tener consecuencias laborales, como por ejemplo, el aumento de accidentes. Por otro lado, se ha demostrado la efectividad del uso del inmunoensayo enzimático junto con otros criterios clínicos para identificar los metabolitos de dichas sustancias, sin embargo, de aquí surge la necesidad de conocer con qué exactitud está trabajando el método. Al obtener resultados confiables se descarta la necesidad de utilizar otras técnicas de mayor costo e inversión, además la importancia de asegurar la calidad de los resultados, que finalmente es labor del Laboratorio de Química Forense.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la sociedad el uso de sustancias ilegales se ha convertido en un problema de salud pública, siendo el consumo de estas en individuos de diversas edades, incidiendo principalmente en jóvenes e inclusive en infantes, a una edad cada vez más temprana.

Generalmente los problemas más comunes de inicio a esta actividad están ligados a problemas psicosociales tales como problemas familiares, económicos, etc. Pero que principalmente están ligados a problemas de delincuencia organizada. Esto desencadena una serie de eventos desde el núcleo familiar hasta situaciones legales en donde se ven implicadas personas intoxicadas con estas sustancias. Las drogas de abuso se pueden clasificar de diferentes formas: las drogas legales e ilegales, dentro de las drogas de abuso legales tenemos presentes en la sociedad: el alcohol etílico, la cafeína y la nicotina, las ilegales naturales como la marihuana, peyote, hongos alucinógenos, etc. De igual manera, las drogas sintéticas de las cuales existe un mundo de ellas [1-2]. Para este estudio analizaremos los metabolitos de las siguientes drogas: marihuana, cocaína, anfetaminas, y derivados opiáceos. Debido, entre otras cosas, a su bajo costo, fácil adquisición o bien su potencial adictivo, son las de mayor uso en el Estado.

En la actualidad, el uso inadecuado de las drogas de abuso, constituye un grave problema debido principalmente a que las personas bajo los influjos de alguna droga pueden cometer actos que pueden causar accidentes, tanto en el ámbito familiar como en el laboral y por tanto a nivel de sociedad [3-4]. La emisión de un dictamen con un resultado positivo podría ocasionar multas o incluso el encarcelamiento de los consumidores, por tal motivo, necesario determinar el resultado correcto mediante la validación de las pruebas que confirmen la presencia de drogas prohibidas [5].

La Verificación del método ya mencionado puede tener fines médicos, legales o forenses, en el ámbito forense, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) es la metodología sugerida, sin embargo, debido a su costo tan elevado es sustituida por métodos de análisis como el inmunoensayo enzimático, del cual, resulta indispensable conocer todas las características de desempeño debido a que esta técnica posee características como son: exactitud, precisión y veracidad.

1.3 PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

En el presente trabajo, se realiza una Verificación del método mediante la validación proveniente del fabricante. La técnica de un inmunoensayo enzimático de tipo competitivo por medio del sistema Viva-E® utilizando los reactivos de Emit®, como pruebas de detección cualitativas para la determinación de estas drogas. Organizaciones como la SEDENA, consideran a la cocaína, marihuana, anfetaminas y derivados del opio como las drogas de mayor abuso en combinación con el consumo de etanol. Además de observarse con altos índices de incidencia en las personas que cometen algún acto ilícito o se ven involucrados en algún accidente vial. La identificación de los metabolitos de drogas de abuso con un alto nivel de precisión y mediante un método validado, se vuelve primordial debido a que la situación laboral o jurídica de las personas involucradas cambia radicalmente dependiendo del resultado que se obtenga.

La técnica de inmunoensayo enzimático presenta una buena confiabilidad lo que permite utilizarla como método de detección en el área de toxicología forense. En cuanto a la exactitud resultan también ser un método de análisis rápido y confiable obteniendo resultados cualitativos por tales motivos es necesario que se lleve a cabo este tipo de Verificación para las validaciones provenientes del fabricante.

Tomando en cuenta la importancia de todos los aspectos pasaremos ahora a construir la *hipótesis* de trabajo:

“Se puede realizar la Verificación del método de inmunoensayo enzimático de tipo competitivo, de acuerdo a la validación realizada por el fabricante”

1.4 VARIABLES

Planteada la hipótesis ahora se describen las variables que ejercen influencia sobre ella, reconociendo el tipo de variables de las cuales depende el desempeño de la hipótesis, de la misma manera ahora se conocen las variables que tienen un comportamiento de forma independiente, se clasifican como variables dependientes e independientes para el desempeño de la hipótesis.

1.4.1 VARIABLES DEPENDIENTES

- ❖ Humedad
- ❖ Temperatura ambiental
- ❖ Temperatura de almacenamiento
- ❖ Temperatura de reacción
- ❖ Volumen de muestreo

1.4.2 VARIABLES INDEPENDIENTES

- ❖ Operador
- ❖ Metabolitos de drogas

1.5 OBJETIVOS

Los objetivos permiten percibir los alcances o las limitaciones de la investigación, y ahondar sobre la intención buscada en el desarrollo experimental. Esto es fundamental para cumplir con la hipótesis de trabajo, con el fin de realizar un enfoque que permita desglosar de forma efectiva la investigación se puede clasificar en objetivo específico y general.

1.5.1 OBJETIVO GENERAL

Comprobar los valores de la validación realizada por el fabricante del método de inmunoensayo enzimático en los parámetros de exactitud: precisión y veracidad, utilizando el método cualitativo, por medio de un equipo semi-automatizado.

1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este trabajo de tesis se basa en la confirmación de la validación proveniente del fabricante y en este contexto los insertos indican los siguientes parámetros a evaluar:

- Evaluar la exactitud del método de identificación de metabolitos de drogas de abuso mediante inmunoensayo enzimático en orina, al evaluar la exactitud. Se comprueba la validez del método
- Evaluar la precisión: para observar los posibles errores aleatorios del método que son poco perceptibles y difíciles de detectar, utilizando la repetibilidad y reproducibilidad.
- Evaluar veracidad: para observar los posibles errores sistemáticos del método que estos indican que el método está funcionando de forma inadecuada, utilizando la ecuación de la diferencia crítica [72].

1.6 DELIMITACIÓN DEL TEMA

El presente trabajo de confirmación de la validación del método procedente del fabricante se llevó cabo en el laboratorio de Química y Genética Forense de la Procuraduría general de Justicia del Estado de Michoacán de Ocampo que se encuentra ubicado sobre el Periférico Independencia No. 5000, colonia Sentimientos de la Nación C.P. 58170 en la ciudad de Morelia bajo la supervisión de los Peritos en Química Forense: M. en F.B. Elisa López Loeza y Q.F.B. Jorge Galileo Ruiz Jiménez durante los meses de Agosto 2010 a Marzo 2011 con el instrumento EMIT viva "E" de SIEMENS, número de serie 6-7340. El presente trabajo está delimitado a muestras de orina debido a que en ella se encuentran los metabolitos de forma más viable y optima, a diferencia de otro tipo de muestras como lo puede ser sangre completa, cabello, saliva, aliento, leche materna y meconio. En la orina se encuentran los metabolitos desde el primer contacto con la droga y pueden estar presentes por varios días en consumidores esporádicos y meses en consumidores frecuentes.

Con el planteamiento del problema, partiendo de una premisa inicial de la existencia de un mejor comportamiento de los calibradores/controles, se estableció la hipótesis, que es sometida a la experimentación, tomando en cuenta las diferentes variables que influyen para su evaluación. En el próximo capítulo, se describen los diferentes aspectos teóricos alrededor de la hipótesis como son: los principales requisitos que marca la norma y los organismos de normalización, las definiciones y procedimientos, que son sugeridos para realizar una validación, así como el análisis de estudios relacionados con el tema, mismos que permiten la utilización de un lenguaje formal en el análisis e interpretación del estudio realizado.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

La elaboración de este capítulo da las bases teóricas que permitan disertar en el momento de interpretar una Verificación, así como la forma más apropiada del análisis de los resultados. Desde luego que para entender e interpretar adecuadamente, es necesario construir una base teórica que debe de incluir jurisprudencia de las normas que giran en torno a los métodos de validación analítica y se tuvo una revisión de estudios que anteceden a esta investigación.

Por tal motivo la elaboración de este capítulo se divide en tres partes fundamentales que están estrechamente ligadas las cuales son: marco teórico o conceptual, marco jurídico y marco histórico, los cuales se definen a continuación.

El marco teórico es el primero que se define en él, se encuentran los procesos teóricos que involucran a una validación así como las generalidades de las drogas de abuso, de los metabolitos presentes en la orina; en el marco jurídico se menciona algunos de los requisitos que se marcan en la norma para llevar a cabo una validación y las normas generales para drogas de abuso y en el marco histórico se establece una relación con investigaciones que preceden para que se aproximen a la resolución del problema planteado.

El revisar los conceptos teóricos, las normas existentes y trabajos anteriores, en este capítulo permite crear una base teórica que ayude a realizar una mejor interpretación de los resultados obtenidos y la solución de problemas que se presenten durante el desarrollo del experimento.

2.1 MARCO TEÓRICO

En el marco teórico se establecen los principales conceptos y procedimientos sugeridos por las diferentes referencias revisadas, con ello se comprende cómo se realiza una validación. Se revisan los criterios que se marcan para los diferentes parámetros de validación que se tienen que calcular.

Por tal motivo se definen los conceptos de : drogadicción, droga, estructura química, metabolitos, y métodos de detección más comunes, para este caso se abordara el tema de inmunoensayo enzimático. Posteriormente se definen los términos validación y Verificación que son los términos más relevantes que se deben conocer, para después establecer los objetivos y posteriormente dar la solución a las interrogantes; ¿Cuándo?, ¿Por qué? y ¿Quién realiza un proceso de validación?

Por último se describen las técnicas que comúnmente se utilizan para llevar a cabo una validación y se mencionan los tipos de validación existente así como las etapas que involucran el proceso de validación.

Al realizar el procedimiento de una validación, con el cálculo para cada parámetro de desempeño del método a los cuales se les describen sus principios fundamentales y el procedimiento que cada parámetro requiere para realizar su determinación, y de este modo abordar los criterios que se toman en cuenta para considerarlo como el valor aceptable del parámetro y que cumple con el proceso de validación.

2.1.1 DROGADICCIÓN

La drogadicción es una enfermedad crónica del cerebro, a menudo con recaídas, caracterizada por la búsqueda y el uso compulsivo de drogas a pesar de las consecuencias nocivas para el adicto y para los que le rodean. La drogadicción se considera una *enfermedad del cerebro* por que el abuso de drogas produce cambios en la estructura y en el funcionamiento del cerebro. Si bien es cierto que en el caso de la mayoría de las personas la decisión inicial de tomar drogas es voluntaria, con el tiempo los cambios en el cerebro causados por el abuso repetido de las drogas pueden afectar el autocontrol y la habilidad del usuario para tomar decisiones sensatas, al mismo tiempo que envían impulsos intensos de usar drogas [6-7].

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se entiende por drogodependencia “un esquema de comportamiento en el cual se da prioridad al uso de una sustancia frente a otros comportamientos considerados antes como más importantes”. Hablamos de dependencia física cuando el uso es recurrente de una droga genera una adaptación fisiológica por la cual el funcionamiento orgánico del sujeto se ve alterado si no se administra la sustancia, o si la dosis consumida se reduce por debajo de cierto umbral. Si una vez establecida esta dependencia y se interrumpe o se reduce la administración de la droga, aparecerá un síndrome de abstinencia específico. El síndrome de abstinencia se da cuando la droga se ha incorporado al metabolismo del sujeto. El organismo se ha habituado a la presencia constante de la sustancia, de tal manera que necesita mantener un determinado nivel en la sangre para funcionar con normalidad [8].

Según la APA define a la dependencia de sustancias tóxicas como un conjunto de síntomas que indican que el individuo siga consumiendo la sustancia a pesar de presentar problemas importantes relacionados con su consumo [9].

Por tales motivos la drogadicción es un problema que causa estragos a nivel de sociedad, en el laboratorio de Química y Genética Forense se analizan muestras de consumidores involucrados en actos ilícitos, en seguida se describe que es una droga, se analizaran sus muestras por medio de la técnica de inmunoensayo y el hecho de realizar una Verificación garantiza resultados técnicamente válidos.

2.1.2 ¿QUÉ ES UNA DROGA?

La presencia y el consumo de sustancias psicoactivas no es algo nuevo en ninguna sociedad. Por el contrario, su existencia está documentada en la historia de la mayoría de las culturas, con variaciones en los tipos de drogas, los patrones de uso, sus funciones individuales, sociales y las respuestas que las sociedades han ido desarrollando a través del tiempo. Las sustancias psicoactivas eran usadas en la antigüedad dentro de las prácticas sociales integradas a la medicina, la religión y lo ceremonial [10].

La ambivalencia social hacia las sustancias adictivas encuentra su mejor expresión en el antiguo vocablo griego *pharmakon*, que significa tanto medicina como veneno, algo que salva o quita la vida [11].

La palabra droga tiene su origen en el vocablo holandés “droog”, que significa “seco”, el cual etimológicamente surgió a raíz de la llegada de las plantas medicinales a Europa, provenientes de América y que eran llevadas allí en su forma desecada [12].

La definición de droga propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se refiere a todas las sustancias psicoactivas como: "...cualquier sustancia que introducida por cualquier vía, al interior de un organismo vivo, puede modificar su percepción, estado de ánimo, cognición, conducta o funciones motoras". Esto incluye el alcohol, el tabaco y los solventes y excluye las sustancias medicinales sin efectos psicoactivos [12].

2.1.3 GENERALIDADES DE LAS DROGAS DE ABUSO PARA EL ESTUDIO

Para comprender el proceso de una Verificación es necesario antes de esto comenzar por conocer las generalidades de cada una de las drogas para el estudio, las cuales son las siguientes: aspectos históricos, estructura química y metabolitos. Para este estudio estas características son las de mayor relevancia.

2.1.3.1 CANNABIS

La planta del cáñamo *Cannabis sativa*, parece ser que se conoce desde hace unos 8000 años, en documentos chinos de estas fechas se mencionan, se han utilizado sus fibras para fabricar cordel, ropas, calzado y papel, sus semillas como alimento y su resina por su poder curativo [14].

En 1948 la Organización Mundial de la Salud, (OMS), llegó a la conclusión de que el uso del *Cannabis* era peligroso desde cualquier punto de vista, ya sea físico, mental o social. El cáñamo es una planta herbácea, dioica de cosecha anual, perteneciente a la familia de las urticáceas originarias de Asia central. Es una planta resistente, puede medir de 1 a 7 metros, presenta tallos acanalados con hojas palmeadas y partidas, de forma lanceolada con bordes serrados, número impar de lóbulos, exudan una resina que las hace pegajosas al tacto. Las flores son apetalares, con coloración entre verde y amarillo, pudiendo ser masculinas o femeninas. El fruto, cañamones, tiene forma globular, de unos cinco milímetros de diámetro de color marrón grisáceo, se emplea en alimentación, especialmente de aves y para extracción de aceite [15].

2.1.3.1.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

Aunque la principal sustancia psicoactiva del Cáñabis es el THC (tetrahidrocannabinol), la planta contiene en total cerca de 60 cannabinoides, que se presenta en muchas variedades, siendo la más activa Δ^9 -THC. Los porcentajes entre estos alcaloides influyen en la manera en que cada planta actúa a nivel cerebral [16,18].

Para la marihuana se encuentra el principio activo como: Δ^9 tetrahidrocannabinol que se representa en la imagen 2.1.3.1.1.1.

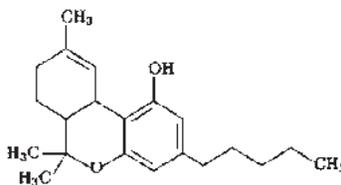


Figura. 2.1.3.1.1.1 El Δ^9 -tetrahidrocannabinol es el principio activo del consumo de la marihuana por tal motivo este va a ser importante en el análisis, que indica si la persona consume o no marihuana [19].

2.1.3.1.2 METABOLITOS

Los metabolitos de las drogas de abuso forman la parte medular de esta tesis, de esto depende la presencia o ausencia de consumo de las drogas de abuso debido a la naturaleza del metabolismo y características de las drogas consumidas y las características propias de cada individuo. El metabolismo es distinto, pero los metabolitos a identificar no van a cambiar aunque para el metabolismo de cada uno de ellos producen muchos tipos diferentes de metabolitos, como por ejemplo para la *Cannabis* se tienen registrados hasta el momento 61 cannabinoides diferentes, pero de mayor importancia se tiene al 11-nor- Δ^9 -THC-9-COOH representada en la figura 2.1.3.1.2.1, así de cada droga de este estudio se mencionaran los metabolitos de mayor importancia para cada una de las drogas [17,20].

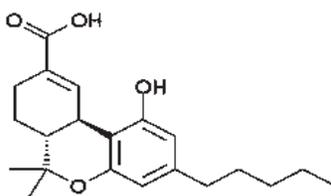


Figura. 2.1.3.1.2.1 El principal metabolito del consumo de *cannabis* tenemos al 11-nor- Δ^9 -THC-9-COOH de importancia para este estudio, este metabolito es el que el instrumento detecta [21].

2.1.3.2 COCAINA

La cocaína se considera la droga de abuso probablemente más utilizada. El principal alcaloide del arbusto conocido como “coca” (*Erythroxylon coca*) es la benzoilmetilecgonina, cuyas formas de presentación reconocidas son: cocaína base libre purificada (crack o rock), cocaína de base pura, sulfato de cocaína (pasta de coca) y clorhidrato de cocaína. Al igual que la marihuana, su consumo se remonta a civilizaciones del mundo antiguo con fines medicinales y vigorizantes.

En las postrimerías del siglo XIX y principios del XX se adicionó a bebidas no alcohólicas, las cuales fueron prohibidas en 1904. Como anestésico local fue empleado por los otorrinolaringólogos en clínicas y hospitales hasta la década de los 50's [23-24].

2.1.3.2.1 ESTRUCTURA QUIMICA

En el caso de la cocaína como es un alcaloide procesado del hoja de *Erythroxylon coca*, de esta provienen muchos alcaloides pero el de interés es la cocaína, se encuentran diferentes tipos y formas de éste, además que en el momento de su venta y distribución la mayoría de los narcotraficantes utilizan diversas sustancias parecidas a la coca en aspecto y color para aumentar su peso y de manera tal que ellos aumentan sus ganancias, pero por lo general se conoce como clorhidrato de coca. En la figura 2.1.3.2.1.1 se muestra la estructura química del clorhidrato de cocaína o Benzoilmetilecgonina

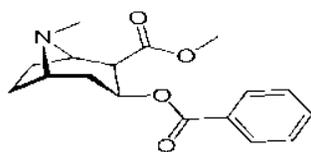


Figura. 2.1.3.2.1.1. En la cocaína el principio activo es el clorhidrato de coca este es el alcaloide ya extraído de las hojas de *Erythroxylon coca*. Su nombre científico es Benzoilmetilecgonina [25].

2.1.3.2.2 METABOLITOS

Al igual que en el consumo de marihuana la cocaína también se dan varios metabolitos pero entre los más importantes se tienen a la benzoilecgonina [20]. Y en la figura 2.1.3.2.2.1 se muestra la estructura de este metabolito siendo este, el metabolito que será detectado mediante la técnica de inmunoensayo.

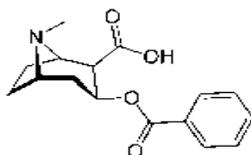


Figura. 2.1.3.2.2.1 Benzoilecgonina es el principal metabolito después del consumo de cocaína [26].

2.1.3.3 ANFETAMINAS

Son sustancias que se mantienen en una dualidad constante: son fármacos y «drogas», legales e ilegales, antiguas y actuales; quizás sean las sustancias de síntesis que han sobrevivido más tiempo en el mercado (son más antiguas que la Aspirina), la investigación que se realiza sobre las anfetaminas está impulsada por el abuso que se

hace de los derivados de consumo más extendido como el «éxtasis». Los avances científicos revelan un mecanismo de acción complejo debido fundamentalmente a la analogía estructural con los neurotransmisores y la capacidad para actuar sobre diversas áreas del cerebro con los subsiguientes efectos.

La estructura original de la dextro-anfetamina, que ha dado lugar a este grupo tan numeroso de derivados, se sintetizó en 1887, aunque sus efectos psicoestimulantes no se describieron hasta 1933 cuando se buscaba un sustituto de la Efedrina para el tratamiento del asma. Se hallaron además, otras acciones que prometían un potencial uso terapéutico. En 1914 se recoge la patente (Merck) de drogas como el MDMA, más conocido como Éxtasis. En la actualidad, las modificaciones de la molécula se dirigen en dos sentidos: en el ámbito terapéutico, con la búsqueda de sustancias en las que predomine el efecto anorexígeno sobre el estimulante del SNC; y en el ámbito ilícito, buscando estructuras en las que la acción estimulante se transforme en alucinógena, consiguiendo cada vez mayor potencia [27-30].

2.1.3.3.1 ESTRUCTURA QUIMICA

Las anfetaminas se representan generalmente con una estructura fenilisopropilaminica estos son compuestos de origen sintético su estructura química es la siguiente y se presenta en la figura 2.1.3.3.1.1.

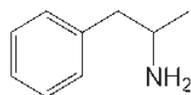


Fig. 2.1.3.3.1.1 Fenilisopropilamina. Las anfetaminas son aminas simpatomiméticas o adrenérgicas, de fórmula química estructural semejante a la adrenalina. Estos compuestos químicos son de origen sintético [31- 32].

2.1.3.3.2 METABOLITOS

Se sabe que sus metabolitos son muy pobres, por lo general se da un metabolismo de entre el 50-70% de la dosis administrada, se da un metabolismo hepático y se conocen hasta el momento 17 metabolitos diferentes. Por lo general se excreta la droga tal cual de forma activa [20]. Por tal motivo en este tipo de sustancias el instrumento no detectara metabolito alguno sino más bien la droga como tal en forma de d, l anfetamina.

2.1.3.4 DERIVADOS DEL OPIO

Con el nombre de opio se reconoce la “exudación lechosa desecada, obtenida por la incisión de la corteza verde del *Papaver somniferum* (Linneo) o su variedad *Alba de Candolla* (Familia *Papaveraceae*)”. El término proviene de la palabra griega *opio*, que significa *jugo*. En su estado desecado normal debe dar no menos de 0,5 % de morfina anhidra, principal alcaloide fenantrénico. *Opio* (*Papaver somniferum*). De igual manera se expresa en la farmacopea, donde se considera como el “látex” obtenido por incisiones de la cápsula aún verde del *Papaver somniferum* (Linneo) y sus variedades (*Papaveraceae*). De estructura fenantrénica o bencilisoquinolínica [33].

La morfina, aislada por primera vez por Friederich W.A. Serturmer en Hannover, Alemania, en época tan temprana como 1805, tomó su nombre del griego Morfeo (Dios del Sueño) en virtud de las características de este último. Así, el opio, y los opiáceos ejercen su acción sobre los receptores opiáceos de modo similar a las endorfinas, solo que de una forma desmedida, al alterar las funciones fisiológicas [24].

2.1.3.4.1 ESTRUCTURA QUIMICA

Para los derivados del opio vamos a tener varias estructuras químicas, de éstos, las drogas que se consumen más comúnmente son la heroína, codeína, morfina, etc. [34]. En la figura 2.1.3.4.1.1 se muestra la estructura química de la droga más adictiva de los derivados del opio, la heroína.

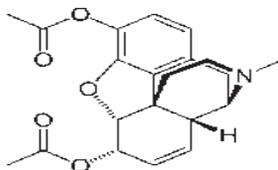


Figura 2.1.3.4.1.1 Diacetilmorfina o heroína es la droga de abuso más adictiva de los opiáceos [35].

2.1.3.4.2 METABOLITOS

Para el metabolismo de los derivados del opio esto va a depender por ejemplo si se consume la heroína, el metabolismo va a producir 6 monoacetilmorfina después de esta se obtiene a la morfina y de esta se pueden dar tanto morfina 3 o 6 g lucuronido [20]. Por lo tanto a continuación se agrega una imagen del metabolito de mayor importancia presentes en el consumo de heroína en la figura 2.1.3.4.2.2.

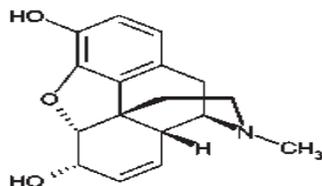


Figura 2.1.3.4.2.2 Representación de la molécula de morfina uno de los metabolitos del consumo de heroína, esta es más comúnmente utilizada como analgésico [36].

2.1.4 MÉTODOS DE DETECCIÓN MÁS COMUNES

En este apartado se abordarán los métodos de detección más comunes de los metabolitos de las drogas de abuso, como ya se ha mencionado la detección de estos puede tener varias repercusiones o fines que los interesados pudieran requerir por tal motivo en esta parte toma importancia en este estudio, de aquí comenzaremos a trabajar como se menciona en el capítulo uno con inmunoensayo.

Estos van a variar con el tipo de muestra dependiendo de la funcionalidad de cada método, debido a que se trabaja con metabolitos y las vías de expulsión del organismo son varias, el tipo de muestra es igual como por ejemplo tendremos métodos que van a utilizar: sangre completa, cabello, sudor, leche materna, orina, etc. Para el estudio y de acuerdo al método se trabajará con orina. Algunos de los métodos más conocidos han sido:

- Como métodos preliminares existen varios de los cuales tenemos a los siguientes:
 - CROMATOGRAFIA
 - INMUNTURBIDIMETRIA
 - RADIOINMUNOENZAYO
 - **INMUNOENSAYO ENZIMATICO**
 - INMUNOENSAYO DE POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA
- Como métodos confirmatorios:
 - CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPADA A ELECTROMETRIA DE MASAS (CG/MS)
 - Además de los criterios clínicos y el juicio profesional

2.1.4.1 CROMATOGRAFIA

La cromatografía consiste en la separación del componente sólido y del contenido líquido del fluido que se examina. El sedimento sólido es tratado químicamente para extraer los compuestos que contiene. Tras exposición a diversos reagentes, la presencia de una droga determinada produce un cambio de color. Este cambio de coloración se interpreta como un resultado positivo. La cromatografía es un método sencillo y de bajo costo, que por estos motivos se emplea con mucha frecuencia para la detección de diversas drogas en orina. Sin embargo, esta técnica es poco sensible para la detección de drogas de abuso. Para la identificación de una muestra positiva se requieren concentraciones elevadas, mientras que con el inmunoensayo bastan concentraciones mínimas [18].

2.1.4.2 INMUNOTURBIDIMETRIA

Es una técnica de inmuno-precipitación que utiliza la dispersión de la radiación para la medida de la velocidad de inmuno-complejos in vitro. Las primeras aplicaciones de las técnicas basadas en la dispersión de la luz para estudiar la cinética de reacción antígeno anticuerpo fueron realizadas en 1938 por Libby. En 1970, los trabajos de Savory sobre la cinética de reacción antígeno anticuerpo abrieron el camino para su estudio. No obstante, no se generalizó el empleo de los mismos hasta que la tecnología en la producción de anticuerpos específicos y la instrumentación necesaria no evidenciaron un notable desarrollo [37].

2.1.4.3. RADIOINMUNOENSAYO

El desarrollo de los inmunoensayos prácticos comenzó en los años '60 con la aplicación de radioinmunoensayos. El método basado en RIA utiliza isótopos radioactivos como marca y la concentración de radioactividad medida indica la concentración de mensurando presente. Aún se usan en la actualidad, particularmente para la detección de cantidades muy bajas de analitos. Sin embargo, debido a las complicaciones inherentes al manipuleo y desecho de los materiales radioactivos en el laboratorio clínico, RIA se usa con menos frecuencia que otros tipos diferentes de inmunoensayos [38].

2.1.4.4. INMUNOENSAYO DE POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA

Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia (FPIA) es un tipo de inmunoensayo homogéneo competitivo por fluorescencia. Con la unión competitiva, el antígeno de una muestra y el reactivo marcado antígeno-fluoresceína (AgF) compiten por los puntos de unión en el anticuerpo. Como inmunoensayo homogéneo, la reacción se lleva a cabo en una solución de reacción simple, y el complejo Ab-AgF no requiere un paso de lavado para separarlo de la marca AgF “libre”.

FPIA se utiliza para proporcionar una medición exacta y sensible de pequeños analitos de toxicología como pueden ser las drogas terapéuticas, y las drogas de abuso, toxicología y algunas hormonas. FPIA utiliza tres conceptos claves para medir analitos específicos en un formato homogéneo: fluorescencia, rotación de moléculas en la solución y luz polarizada. Fluorescencia: La fluoresceína es una marca fluorescente. Absorbe la energía de la luz a 490nm y libera esta energía a una longitud de onda superior 520nm como luz fluorescente [38].

2.1.4.5. INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO

El EIA surge debido a la necesidad de cuidar el medio ambiente, disminuir los riesgos en la salud, menor costo, sencillez y practicidad. Se desarrolló de manera independiente por *Stratis Avrameas* y *Pierce* alrededor de los años 60s, las primeras publicaciones se dan en 1966 por *Ancho* y *Porath*. El nombre *enzyme-linked immunosorbent assay* luego fue abreviado como ELISA, fue acuñado por los investigadores suecos *Eva Engvall* y *Peter Perlmann*, describieron el procedimiento, publicado en 1971. El mismo año el procedimiento era objeto de otro artículo de los holandeses *Bauke Klaas Van Weemen* y *Antonius HWM Schuurs*. Las aplicaciones más interesantes se iniciaron en el campo de la microbiología y la parasitología en Londres. Son aplicados en el diagnóstico médico, la industria de los alimentos así como en el estudio y control del medio ambiente, en la actualidad sus usos donde tienen mayor impacto son: estudios serológicos, hematológicos, endocrinológicos, oncológicos, en trasplantes, medicina forense y en la antropología [39].

En EIA, las marcas de las enzimas se usan en lugar de las marcas radioactivas. Las marcas típicas de enzimas son la fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, y la galactosidasa B. EIA típicamente usa un cambio de color, emisión de luz, u otra señal. Se requiere un equipo específico para obtener la concentración de enzimas presentes midiendo el cambio específico que ocurrió [38-40].

ELISA, o Enzimo-inmunoensayo, representa una aplicación popular del inmunoensayo sándwich heterogéneo de fase sólida que combina un reactivo marcado enzima anticuerpo con un anticuerpo unido a una fase sólida. Un ensayo ELISA es un tipo de EIA. Inicialmente, se utilizaban como material de base sólida [40].

Hacia fines de la década del '70 y durante los años '80 y '90, se lograron avances en lo que se refiere a la automatización y sensibilidad de los inmunoensayos, y EIA en particular [38].

Teniendo contemplado cómo funciona un inmunoensayo ahora definiremos cual es el principio de el método de estudio para tener una mejor comprensión.

El ensayo de metabolitos de drogas de abuso Emit® II Plus es una técnica de enzimo-inmunoensayo para analizar estos compuestos específicos presentes en la orina humana. El ensayo se basa en la competencia entre la droga presente en la muestra y la droga marcada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PHD) por los sitios de unión del anticuerpo. La actividad de la enzima se reduce en función de la vinculación con el anticuerpo, de tal manera que la concentración de la droga de la muestra puede medirse en términos de actividad enzimática. La enzima activa convierte la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) en NADH, originando un cambio de absorbancia que se mide espectrofotométricamente. El suero endógeno G6PHD no interfiere, la coenzima NAD funciona solo con la enzima bacteriana (*Leuconostoc mesenteroides*), utilizada en el ensayo [41]. La reducción del NAD a NADH proporciona un cambio de absorbancia la cual indica la presencia o ausencia de los metabolitos de las drogas de abuso.

Ahora bien se describió cómo funciona la técnica del inmunoensayo enzimático pasaremos a abordar un poco el tema de espectrofotometría que es la forma en que vamos a medir los cambios de concentración de la reacción como lo es la absorbancia.

2.1.4.5.1 ESPECTROFOTOMETRÍA

Las técnicas espectroscópicas se basan en la interacción de la radiación electromagnética con la materia. A través de esta interacción, las moléculas pueden pasar de un estado energético a otro estado energético distinto, de un estado de más baja energía, estado fundamental, a un estado de mayor energía, estado excitado, absorbiendo una cantidad de energía radiante igual a la diferencia energética existente entre los dos niveles. Debido a la existencia de diferentes tipos de energía las moléculas pueden interactuar con radiaciones electromagnéticas de un rango amplio de longitudes de onda, dando lugar a distintos tipos de espectroscopias según las diferentes regiones [42-43]. El espectro se define como la representación gráfica de la distribución de intensidades de la radiación electromagnética emitida o absorbida por la materia, en función de la longitud de onda de dicha radiación. Los espectros son debidos a transiciones entre estados de energía característicos de la materia, y pueden ser de emisión, que se obtiene excitando adecuadamente la materia para que emita radiación electromagnética y de absorción, obtenidos sometiendo a la materia a una radiación electromagnética continua y representando la proporción de radiación absorbida por la misma en función de la frecuencia o longitud de onda [43]. La espectrofotometría se refiere a los métodos cuantitativos, de análisis químico que utilizan la luz para medir la cantidad de energía que es absorbida por una muestra que contiene una especie absorbente, que comparándola con la cantidad de energía absorbida por otra muestra de concentración conocida, tomando como referencia una solución la cual no contiene la sustancia que absorbe radiación, es decir, es la diferencia de intensidad transmitida cuando un haz luminoso atraviesa un blanco de disolvente puro, con respecto a la intensidad transmitida cuando el haz pasa a través de la muestra. Dependiendo de la radiación utilizada se divide en: absorción visible, ultravioleta, infrarroja, entre otras, y se clasifican en métodos espectroscópicos moleculares y atómicos [42-43]. Estos métodos espectrofotométricos se basan en la medición de dos parámetros, *Absorbancia* y *transmitancia*, los cuales mencionaremos a continuación:

- **TRANSMITANCIA:** Es la relación entre la intensidad de radiación transmitida por una muestra y la intensidad de radiación que incide sobre la muestra, medidos ambos en la misma posición del espectro, es decir, la transmitancia indica la cantidad de radiación que no es absorbida. Si la transmitancia es alta, la absorbancia

es baja, en virtud de que la especie absorbente no tiene afinidad por este tipo de radiación. La escala de la transmitancia se expresa comúnmente como porcentaje de 0 a 100% [44-45].

- **ABSORBANCIA:** Es el logaritmo en base diez del recíproco de la transmitancia. En el que el disolvente puro es el material de referencia. La especie absorbente demuestra capacidad de absorber dicha radiación, en cuyo caso la absorbancia tiene un valor alto y la transmitancia es pequeña. La escala de absorbancia es de cero a infinito [44-45].

La medida de la absorbancia se lleva a cabo con la ayuda de un espectrofotómetro, que en esencia consta de un monocromador, prismas o red de difracción, que controla la longitud de onda de la radiación que se hace incidir sobre la muestra. La absorbancia de la muestra se compara con la de una referencia que consta estrictamente de disolvente [46].

2.1.4.6 MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN: CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS (GC/MS)

La cromatografía de gases se basa en calentar la muestra orgánica hasta la ebullición y analizar de mediante una columna de cromatografía que separa los componentes en función de sus características fisicoquímicas. Esta técnica se puede complementar con la espectrometría de masas que consigue una precisión del 100% y detecta cantidades muy pequeñas de las drogas. El elevado costo de esta prueba, hace que se limite la realización de esta prueba a casos seleccionados en los que se precise confirmar el resultado [18].

Ya teniendo contemplados todos los conceptos necesarios para saber cómo se pueden detectar los metabolitos de las drogas de abuso, ahora lo que interesa saber por qué es importante una validación de métodos analíticos y ahora surge la necesidad de comprender todos los términos relacionados con la validación que encontramos en las guías de validación para ello no basaremos en la guía CENAM-Eurachem.

2.1.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS

El término validación de un método, se refiere a la confirmación mediante un examen y establecimiento de evidencia documental que un método analítico cumple con los requisitos para su utilización o aplicación, dando un alto grado de seguridad así como de resultados precisos y exactos [5, 47-48]

En términos estrictos, la validación debe referirse a un sistema analítico y no a un método analítico, debido a que el sistema analítico incluye un protocolo del método definido, un rango de concentración definido para el mensurando y un tipo específico de material de prueba. También, en la actualidad no existe una sola fuente o autoridad reconocida a nivel internacional respecto a la validación de métodos de ensayo y aunque hay avances aún no existe acuerdo unánime entre las diferentes disciplinas respecto a la interpretación de algunos términos relacionados con el proceso de validación y a la aplicación de los mismos [49-50].

2.1.6 OBJETIVO DE UNA VALIDACIÓN

El objetivo primordial de una validación es demostrar que un método se puede utilizar para un cierto tipo de mensurando en una matriz determinada, usando la instrumentación apropiada, con un tratamiento de muestra específico, en un laboratorio equipado y con personal capacitado [48, 51].

2.1.7 ¿CUÁNDO, POR QUÉ Y QUIÉN REALIZA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO?

La validación de un método es un requisito dentro de las determinaciones analíticas, sin embargo, la comprensión de su importancia, del por qué y cuándo debe hacerse aun son deficientes para algunos químicos analistas [5].

La validación de un método se realiza para verificar que los parámetros de desempeño de un método son adecuados para el fin propuesto. En consecuencia la validación de un método se realiza cuando se desarrolla un método nuevo que se quiere implementar

como método de rutina en un laboratorio o simplemente para verificar que el método nuevo es adecuado para el fin propuesto.

- Cuando un método es usado en un laboratorio diferente con instrumentos y analistas diferentes y se quiere ver que el cambio de alguna de estas condiciones no afecta el desempeño del método.
- Se cambian condiciones o se incorporan mejoras que pueden hacer más eficiente o más deficiente al método.
- Se quiere ver la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, un método normalizado y uno nuevo con el fin de validar el método nuevo.

El control de calidad indica que el método está cambiando con el tiempo [5, 48, 51-52].

2.1.8 IMPORTANCIA DE LA VALIDACION

Se tiene que demostrar que el método es útil para el uso propuesto conociendo sus características, capacidades y limitaciones del mismo.

- Se debe garantizar la viabilidad del método si no hay ensayos colectivos ya que estos suelen ser costosos.
- Garantizar que se utilizan correctamente los métodos validados.
- La norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 y la NMX-EC-15189-IMNC-2006 requieren que se validen los métodos.

Cuando alguna medición es importante, costo, salud, y virtualmente cualquier aspecto de la sociedad se respalda de algún modo por una medida analítica y determinar el resultado correcto así como demostrar que es correcto, lo cual en muchas ocasiones influye en la toma de decisiones con base en la medición o resultado [48-49, 51-52].

Una vez conocido el por qué y cuándo se debe hacer una validación, cabe mencionar quien es el responsable de llevar a cabo el proceso de la misma. Si un laboratorio utiliza o pretende utilizar un método, inmediatamente se hace responsable de asegurar que el método se encuentre validado adecuadamente. Cuando se utiliza un método que ha sido publicado por un organismo de normalización el laboratorio necesita establecer los datos de desempeño para su propio uso [5].

2.1.9 TÉCNICAS DE VALIDACIÓN

Una validación se lleva a cabo para conocer el nivel de desempeño de un método, estas no son obligatorias o exclusivas, sin embargo sirven como una guía inicial para realizar una validación de un método. Las técnicas de validación que menciona la norma son las siguientes [53]:

- Calibración usando patrones de referencia o materiales de referencia. El uso de patrones de referencia constituye el mejor punto de partida para llevar a cabo una calibración, pero esta acción no contribuye a validar un método. Sin embargo, si el resultado de la calibración es comparado con un patrón o material de referencia y existe igualdad entre los resultados, entonces la validación del método pudiera conseguirse.
- Comparación de resultados alcanzados con otros métodos. Cuando los resultados de dos o más métodos coinciden, considerando su incertidumbre y usando patrones de referencia, se demuestra que los principios teóricos y de desempeño individual son consistentes entre sí, de modo que prácticamente se garantiza la validez de los métodos comparados.
- Comparaciones entre laboratorios. Cuando los resultados de varios laboratorios coinciden, considerando su incertidumbre, y estos fueron obtenidos por medio de métodos distintos usando patrones de referencia, la validez de los métodos queda completamente garantizada. Sin embargo, si los resultados fueron obtenidos con un método común la garantía de validez podría ser limitada.
- Evaluación sistemática de los factores que tienen influencia en los resultados. Si un método se desarrolla incorrectamente puede tener errores sistemáticos que pueden causar en el resultado un efecto mayor al producido por factores de influencia evaluados. Por ello, la garantía de esta técnica para validar métodos es limitada.
- Evaluación de la incertidumbre de los resultados con base en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y de la experiencia práctica. En muchas ocasiones el desarrollo de métodos alternos para validar métodos resulta ser costoso y complicado. Adicionalmente la comparación entre laboratorios no siempre es posible debido a la disponibilidad de patrones adecuados, altos costos, entre otros. Por ello, la validación de métodos se respalda mediante esta técnica empleando exhaustivamente argumentos científicos ampliamente descritos y

desarrollados, análisis de resultados de experimentos, evaluaciones, caracterizaciones y en general, datos que permiten determinar la validez del método. La garantía que ofrece esta técnica resulta ser limitada, pues los posibles errores sistemáticos del método pueden no estar considerados en la evaluación de incertidumbre. Este tipo de técnica requiere una profunda y exhaustiva documentación.

2.1.10 ETAPAS DE UNA VALIDACIÓN

Para llevar a cabo el proceso de una validación es necesario conocer las etapas que abarca, las cuales mencionaremos de manera breve:

- Primero se establecen las condiciones, requisitos y el alcance de la validación a cumplir, ya sea para los parámetros de validación en forma individual o conjunta. En el caso más sencillo ya fueron establecidas por el cliente del laboratorio o por alguna instancia oficial. En caso contrario, deben ser definidos por el responsable del ensayo de manera confiable y segura.
- Una vez definidos los requisitos a cumplir se lleva a cabo la determinación de los parámetros de validación.
- Finalmente se realiza una evaluación de los resultados obtenidos de los parámetros validados comparados con los requisitos establecidos previamente [54-55].

2.1.11 TIPOS DE VALIDACIÓN

En un proceso de validación existen diversas técnicas, así como diferentes etapas, ahora es necesario comentar también que existen diferentes tipos de Validación, las cuales mencionaremos a continuación [51, 56]:

- *Validación total.* Este tipo de validación se realiza cuando se desarrollan métodos nuevos, métodos no normalizados o cuando un método normalizado sufre modificaciones mayores. En este tipo de validación se calculan los parámetros siguientes: *Recuperación, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Intervalo lineal y de trabajo, Reproducibilidad, Repetibilidad, Sesgo, Incertidumbre, Sensibilidad, Selectividad y Robustez.*

- *Validación Parcial*. También llamada **Verificación** y se debe de realizar para ver que los métodos normalizados cumplen con las características de desempeño en las condiciones del laboratorio. También se debe de realizar cada vez que se realice un cambio menor en algún método normalizado. Aquí es necesario evaluar los siguientes parámetros: *Recuperación, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Intervalo lineal y de trabajo, Reproducibilidad, Repetibilidad y Sesgo*. Si el laboratorio considera que alguno de los parámetros para la Verificación no aplica en función al método seleccionado, esta decisión debe ser justificada técnicamente.

2.1.12 TIPOS DE VALIDACIÓN EN BASE A MÉTODOS CUANTITATIVOS, SEMI-CUANTITATIVOS Y CUALITATIVOS

Aparte de los tipos de validación mencionados existen otros tipos en base al tipo de ensayo que se quiere validar y los clasificaremos de la siguiente manera:

- *Validación de métodos cuantitativos*. En este tipo de validación es necesario calcular los siguientes parámetros: *Sensibilidad, Especificidad, Selectividad; Interferencias, Límite de Detección, Rango y Linealidad, Incertidumbre, Exactitud: Veracidad y Precisión*.
- *Validación de métodos semi-cuantitativos*. Se encuentra entre lo cualitativo y lo cuantitativo y ofrece una cuantificación con Incertidumbre donde los resultados se terminan agrupando en clases: positivo (+++), positivo débil (+), zona gris (+/-), negativo (-).
- *Validación de métodos cualitativos*. En este tipo de validación se asegura la presencia de uno o más analitos en una muestra considerando sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Son métodos de análisis cuya respuesta es de forma binaria, presencia/ausencia, si/no, positivo/negativo, de un mensurando detectado ya sea de forma directa o indirecta en una muestra dada con respecto a un nivel de concentración. Los parámetros a determinar serán los siguientes: *Probabilidad de falsos positivos y negativos, Sensibilidad, Especificidad y Selectividad: interferencias* [57].

2.1.13 MÉTODOS NO REALIZADOS, NORMALIZADOS MODIFICADOS Y NO NORMALIZADOS

La elección del tipo de validación estará en función del método, así como de las características del mismo, los tipos de métodos que se pueden encontrar cuando se quiere realizar una validación son [50, 54, 56].

- *Métodos normalizados.* Estos son métodos desarrollados o publicados por un organismo de normalización reconocido ya sea internacional, nacional o regional u otro organismo reconocido, ejemplos; ISO, AOAC, IUPAC, cuyos métodos son generalmente aceptados por sectores técnicos y que están publicados en normas oficiales. Estos tipos de métodos se deben ejecutar tal y como se establece en su certificado.
- *Método normalizado modificado.* En este método se han hecho cambios que pueden tener repercusión sobre la calidad de los resultados, por ejemplo, cambio en la metodología de extracción, cambio en la matriz, extensión del rango, equipamiento nuevo, entre otros.
- *Método no normalizado y desarrollado por el laboratorio.* Un método no normalizado es un método analítico desarrollado por un tercero que ha sido adaptado por el laboratorio. Un método desarrollado es un método elaborado por el laboratorio o sacado de la bibliografía pero sin datos del rendimiento del método.

2.1.14 PROCESO DE VALIDACIÓN

La validación dependerá del tipo de aplicación que se le dará al método así como de los cambios realizados a este, y de esta manera será la amplitud y exigencia de la validación. Las mediciones analíticas se deben realizar usando métodos que han sido probados para asegurar que se ajustan al propósito del uso [58]. Existen diversos cambios que puede sufrir un método establecido; tenemos cambios mayores que involucran cambio de equipo, mantenimiento, entre otros, en donde se tiene que repetir completamente la validación y cambios menores como las modificaciones del tamaño de muestra, cambios del analista, sustitución de reactivos, entre otros, en donde se debe hacer una validación parcial o Verificación [56, 59].

Es peligroso asumir que sólo porque un método está normalizado uno tiene la garantía que esa validación será adecuada [52]. Por eso, para métodos normalizados el laboratorio debe realizar y presentar evidencia objetiva de la confirmación del método, llamado también *Validación parcial o Verificación*, para demostrar que cumple las especificaciones del mismo y cuenta con la competencia técnica para, realizarlo tomando en consideración sus propias instalaciones, equipos y personal [51].

Durante el procedimiento de una validación no es posible determinar exactamente en donde termina el desarrollo del método y donde empieza la validación. Por lo general muchos de los parámetros de desempeño del método que están asociados a su validación son evaluados, por lo menos, aproximadamente como parte del desarrollo[5].

La validación de un método se limita al ámbito de su aplicación, esto es, el método aplicado a una clase particular de material de prueba. Si existe una variación sustancial en los tipos de matriz dentro de la clase definida, puede existir una fuente adicional de variación debido al efecto de matriz dentro de la clase. Es evidente que si el método se utiliza posteriormente con materiales no pertenecientes a la clase definida, esto es, fuera del ámbito de la validación, el sistema analítico no puede considerarse validado, por que se introduce un error adicional de magnitud desconocida en el proceso de medición [49]. Una vez definidos los requisitos para llevar a cabo la validación se prosigue con la evaluación de los parámetros de desempeño.

2.1.15 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Un parámetro de desempeño o parámetro de validación de un método analítico se le considera como las características cuantificables de un método que indican el grado de calidad del mismo, que necesitan ser evaluadas y que corresponden a: *Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Incertidumbre, Selectividad, Especificidad, Sensibilidad, Robustez, Precisión, Linealidad e Intervalo de medición, Veracidad* y otras características relacionadas con los resultados obtenidos [47, 50, 60]. En el caso particular, debido a las características del método de análisis es cualitativo y en base a una Verificación realizada por el fabricante, los parámetros que utiliza son los siguientes: exactitud, sensibilidad y especificidad.

2.1.15.1 VERACIDAD

El término *Veracidad*, en muchas ocasiones llamado *Exactitud*; aunque la *Exactitud* se considera como la suma de dos conceptos: *Veracidad* y *Precisión* [61], se refiere al grado de coincidencia entre el valor de la media obtenida de una serie de resultados de una prueba y un valor de referencia, la veracidad generalmente se expresa en términos de sesgo, cuanto menor sea el sesgo existente mayor veracidad, este parámetro se relaciona con la presencia de errores de tipo sistemático [49, 54]. Al hablar de error sistemático se refiere al error debido a una alteración que se mantiene durante un periodo de tiempo determinado, y que se expresa en forma de una media aritmética que resulta de un número finito de mediciones del mismo mensurando bajo condiciones de repetibilidad, menos el valor verdadero del mensurando, donde los resultados se desvían en un solo sentido, ya sea por debajo o por encima del valor correcto, siendo errores positivos y otros negativos, la suma de todos ellos se conoce como error sistemático total o sesgo de la medición [5, 56, 62].

Existen diferentes guías que sugieren el procedimiento para evaluar la veracidad de un método, pero de manera general todas coinciden en usar materiales de referencia certificados, preferentemente con matriz semejante a la de la muestra. Solo en el caso de no existir un material adecuado se puede realizar un ensayo de recuperación [52].

2.1.15.2 PRECISIÓN

Este parámetro se refiere al grado de concordancia o conformidad entre los resultados de una serie de mediciones individuales utilizando una muestra homogénea o de diluciones a partir de la misma bajo condiciones establecidas, es decir, se refiere a la dispersión de una serie de mediciones alrededor de su valor central que puede ser expresado en términos de varianza (S^2), desviación estándar (SD) o coeficiente de variación (CV) [5, 47, 50]. La Precisión se relaciona con el error aleatorio el cual es el resultado vinculado con factores que sufren pequeñas variaciones durante la medición, no es controlable y que en mediciones repetidas, varía de forma impredecible [5, 62]. La precisión depende de las condiciones en que se obtienen los resultados, siendo mucho mejor cuando los resultados se obtienen en un mismo día dentro de un mismo laboratorio que cuando se obtienen por diferentes laboratorios [61].

La precisión puede ser considerada por: *repetibilidad* y *reproducibilidad* [5, 47, 50].

- *Repetibilidad*. Es la proximidad o grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando donde los resultados se obtienen con el mismo método o procedimiento de medición, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, usando el mismo equipo, bajo las mismas condiciones y en intervalos de tiempos cortos [5, 48, 50].
- *Reproducibilidad*. Se define como el grado o proximidad de correspondencia entre resultados de la misma magnitud sujeta a medición donde los resultados son obtenidos con el mismo método, sobre una muestra idéntica, por diferentes analistas, en diferente laboratorio, usando diferentes equipos, a la cual la podemos expresar cuantitativamente en términos de dispersión de los resultados [5, 48, 58].

Tanto la *reproducibilidad* como la *repetibilidad* dependen generalmente de la concentración del mensurando y deben determinarse a varias concentraciones y de ser pertinente, deberá establecerse la relación entre la precisión y la concentración del mensurando [5]. La determinación de la reproducibilidad es posible solamente cuando otros laboratorios cercanos utilizan el método de ensayo y es posible una “comparación inter-laboratorios” o cuando se realiza un ensayo de inter-comparación [55].

Los errores aleatorios y sistemáticos pueden ocurrir independientemente unos de otros y surgir en diferentes etapas del procedimiento. El error aleatorio es más fácil de detectar que el sistemático, el segundo no se puede apreciar con una sola repetición de mediciones, y a menos que se conozca de antemano el valor verdadero del mensurando, podrían existir errores sistemáticos graves, que pasen inadvertidos si no se aplican sistemas de control de calidad interno o se participa ensayos de aptitud [56].

2.1.15.3 LINEALIDAD

El término linealidad se refiere a la capacidad de un método analítico para obtener resultados proporcionales, ya sea directamente o por medio de una transformación matemática a la concentración del mensurando del parámetro de la muestra dentro de un intervalo dado, es decir, es el intervalo de concentraciones del mensurando dentro del cual los resultados obtenidos por el método son proporcionales a la concentración del mensurando [5, 47, 58].

2.1.16 REGLAS PARA UTILIZAR MÉTODOS VALIDADOS

Por último cuando un método ya se encuentre validado, ya sea un método desarrollado por otro laboratorio, un método publicado o un método de referencia y se quiere implementar, se deben considerar dos aspectos:

1. ¿La validación existente es adecuada para el fin propuesto o se necesita una validación adicional?
2. Si la validación existente es adecuada, ¿el laboratorio es capaz de alcanzar el nivel de desempeño que el método requiere? ¿él o los analistas son suficientemente competentes? ¿son adecuadas las instalaciones y los equipos?

Ver el nivel de desempeño que el analista puede alcanzar con el método que lo que otros analistas hayan alcanzado en el pasado [5].

Cuando se usan métodos validados se recomienda que se sigan las siguientes reglas para asegurar que se ha alcanzado un desempeño aceptable:

- El analista debe familiarizarse completamente con el método antes de usarlo por primera vez, un experto debe explicar el método y supervisarlo hasta que lo domine.
- Conocer la teoría del método.
- Conocer la estabilidad de los reactivos.
- Evaluar cuántas muestras es conveniente procesar al mismo tiempo, es mejor analizar pocas muestras de manera correcta que analizar muchas y tener que repetir.
- Asegurarse que todas las cosas para el método están disponibles antes de comenzar el trabajo [5, 52].

2.2 MARCO JURIDICO

El conocer mejor las leyes o normas que se observan en torno al proceso de una validación permiten realizar una Verificación de forma más idónea o de manera más eficaz, estas están sujetas al control de los comités evaluadores tanto de nivel internacional y nacional, como en México lo es la *ema* (Entidad Mexicana de Acreditación).

En el marco jurídico se observan los requisitos necesarios para realizar una validación de métodos analíticos establecidos por organismos normalizados así como de organismos relacionados.

Para introducir el marco jurídico se citara: el reglamento de tránsito para dar un enfoque de la importancia de esta tesis para después hablar del la importancia de la ISO Y NOM.

Se revisaran las normas NMX-EC-15189-IMNC-2008: laboratorios clínicos- Requisitos particulares para la calidad y la competencia y la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006: requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

El cumplir con las especificaciones que se marcan en las normas acerca de una validación y si se quiere normalizar el proceso es necesario demostrar que se realizó de acuerdo a lo indicado en la norma.

2.2.1 DEL REGLAMENTO DE TRÁNSITO DEL ESTADO DE MICHOACÁN DE OCAMPO

Según el título tercero capítulo primero de las obligaciones y prohibiciones de los conductores de vehículos:

- *Artículo 46 fracción XI.-* cuando se le solicite y de ser necesario deberá someterse a un examen, para detectar los grados de alcohol en la sangre o **influencia de drogas**, estupefacientes, psicotrópicos y enervantes [69].
- *Artículo 47.-* los conductores de vehículos tienen prohibido:
- *Fracción I.-* conducir cuando sus facultades físicas o mentales se encuentren alteradas por el influjo de bebidas alcohólicas, **drogas, psicotrópicos, enervantes o estupefacientes** [69].

Según el título séptimo capítulo I de los accidentes y su procedimiento:

- *Artículo 108.-* la dirección contara con un médico y un químico, con facultades para expedir certificados de integridad física, lesiones, alcoholemia y **toxicología**, a efecto de certificar o dictaminar el estado de salud de los conductores, pero en caso de accidentes de tránsito vehicular, habiendo delito que investigarse será el ministerio público el que ordene los exámenes pertinentes o el traslado de las personas y de cadáveres [69].

Ahora bien ya teniendo en cuenta las consideraciones generales de por qué es remitida una persona intoxicada, el médico legista en turno se encargara de evaluar a este individuo si presente los signos habituales de haber consumido la sustancias antes mencionadas le solicitara un muestra de orina que será enviada al laboratorio de química forense de la Procuraduría General de Justicia del estado.

Por tal motivo ahora es en donde se da la importancia para la **confirmación técnica de los valores establecidos por fabricante para los metabolitos de drogas de abuso** por tal motivo se revisaran las normas:

- ISO/ EC 17025:2005 NMX-EC-17025-IMNC-2006
- ISO/EC 15189:2007 NMX-EC-15189-IMNC-2008

2.2.2 NMX-EC-17025-IMNC-2006

La cual se refiere a los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Esta norma es de importancia para sostener que vamos a trabajar de forma normalizada.

Algunos organismos tienen sus bases en la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006, la cual pide que se cumplan los siguientes requisitos en los apartados 5.4.2 y 5.4.5:

- 5.4.2 Selección de métodos: el laboratorio de calibración o de prueba debe confirmar que puede aplicar correctamente los métodos antes de utilizarlos para los ensayos o calibraciones usando preferentemente métodos publicados en normas. En caso que el método normalizado cambie se debe repetir la confirmación.
- 5.4.5 validación de métodos:
 - 5.4.5.1 la validación es la confirmación por examen y la provisión de evidencia objetiva que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico propuesto.
 - 5.4.5.2 el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto.
 - 5.4.5.3 el intervalo y la exactitud de los valores que se puede obtener de los métodos validados, por ejemplo, la incertidumbre, límite de detección, selectividad, linealidad, repetibilidad y/o reproducibilidad, sensibilidad, deben ser relevantes con las necesidades de los clientes.

El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto [70].

2.2.3 NMX-EC-15189-IMNC-2008

La cual está destinada a: laboratorios clínicos- Requisitos particulares para la calidad y la competencia, la cual pide que se cumplan los siguientes requisitos en los apartados 5.5.1, 5.5.2 y 5.5.3:

- 5.5.1 El laboratorio debe utilizar procedimientos de examen, incluyendo aquellos para la selección/toma de alícuotas, los cuales integren las necesidades de los usuarios de los servicios del laboratorio y sean apropiados para los exámenes. De preferencia se recomienda la utilización de procedimientos que han sido publicados en libros de texto establecidos/autorizados, textos o revistas especializadas revisadas por pares, o en directrices internacionales, nacionales o regionales. Si se utilizan procedimientos desarrollados por el laboratorio, estos deben validarse apropiadamente para el uso al que están destinados y ser completamente documentados.
- 5.5.2 el laboratorio debe utilizar únicamente procedimientos validados para confirmar que los procedimientos de examen son los apropiados para el uso al que está destinado. Las validaciones deben de ser tan extensas como sea necesario para cumplir las necesidades de la aplicación o campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos y el procedimiento utilizado para la validación.
- 5.5.3 el procedimiento debe basarse en las instrucciones escritas por el fabricante para su uso (por ejemplo, instructivo/inserto), que estén de acuerdo con 5.5.1 y 5.5.2 y que describan los procedimientos como son desarrollados en el laboratorio. Cualquier desviación debe revisarse y documentarse. Información adicional que pueda requerirse para el desarrollo del examen también debe documentarse. Además de los datos de identificación para el control de documentos, la documentación debería incluir, cuando sea aplicable:
 - C) especificaciones de desempeño (linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, intervalo de medición, veracidad de la medición sensibilidad y especificidad [71]).

2.3 MARCO HISTÓRICO

Para determinar que procedimiento se empleará, así como qué parámetros se necesitan evaluar, es necesario revisar los avances que se han tenido en el estudio del tema en cuestión, mismo que describiremos en este marco.

En primera instancia, el avance que se ha tenido en la elaboración de guías de validación que permitan a los laboratorios y organismos llevar a cabo un proceso de validación. Que estos ayudan para desarrollar de mejor manera la confirmación técnica.

Posteriormente se revisarán los estudios que se relacionan y que han obtenido resultados objetivos que puedan servirnos en el desarrollo de la investigación, esto con el fin de no repetir estudios ya realizados y establecer un punto de partida para la investigación.

La importancia del marco histórico radica en que ofrece el conocimiento de estudios que ayudan a tener una mejor interpretación sobre el tema que se está estudiando, a partir de los cuales establecemos el punto de partida para llevar a cabo el planteamiento de la hipótesis y desarrollo experimental.

2.3.1 EVOLUCIÓN EN LA ELABORACIÓN DE GUÍAS DE VALIDACIÓN

La necesidad de demostrar que un sistema analítico funciona adecuadamente ha hecho que desde el pasado instituciones como la ISO, IUPAC y AOAC INTERNATIONAL cooperaran en la elaboración de protocolos o directivas sobre la realización e interpretación de estudios de eficiencia de métodos, sobre ensayos de aptitud y control interno de calidad en laboratorios de química analítica y sobre el uso de datos de Recuperación en las mediciones analíticas [50].

La IUPAC se ha encargado ahora del grupo de trabajo para elaborar protocolos/directrices para la validación de métodos de análisis en un solo laboratorio, las cuales ofrecen recomendaciones mínimas sobre los procedimientos a seguir para garantizar una validación adecuada de los métodos analíticos [50].

La validación es un procedimiento que se debe implementar en todos los laboratorios para asegurar que se está trabajando con un nivel adecuado de seguridad, además que es un requisito que se tiene que cumplir según lo que se indica en la norma NMX-EC-17025.IMNC-2006. En este capítulo se abordó la parte teórica que existe en torno a la validación de métodos, y da una perspectiva sobre los estudios que se han llevado a cabo relacionados con el trabajo. Una vez revisado la base teórica que involucra un proceso de validación, es necesario revisar el método utilizado y el procedimiento a seguir durante el desarrollo de este experimento, temática que abordaremos en el siguiente capítulo.

2.3.2 VALIDACIONES PARA METABOLITOS DE DROGAS DE ABUSO

Cabe mencionar en este apartado de marco histórico que la Verificación proveniente del fabricante es un antecedente, éste debe de llevar a cabo una validación exhaustiva del material de referencia que está comercializando para garantizar a sus clientes, en este caso el Laboratorio de Genética y Química Forense del estado de Michoacán que el material de referencia certificado es de calidad y a su vez el laboratorio pueda brindar a sus usuarios resultados de calidad al realizar la confirmación de este método.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

El propósito de este capítulo es revisar tanto el procedimiento como el método utilizado durante el desarrollo del experimento, por lo tanto se describe de manera detallada los procedimientos seguidos.

También los materiales y equipo utilizado durante la parte de experimentación. Posteriormente se mostraran de manera esquematizada, dando una explicación de cada paso a seguir del método de validación, se describe los procedimientos y el análisis estadístico.

3.1 METODO Y PROCEDIMIENTO

El experimento se basa en la Verificación de la validación prove niente del fabricante con la realización de mediciones consecutivas durante un mínimo de diez días con los calibradores/control a diferentes concentraciones como lo es el calibrador/control nivel 0 el cual no contiene c oncentración alguna de los metabolitos buscados, que es el control negativo , calibrador/control nivel 3 que contiene una canti dad considerable de metabolitos para considerar un resultado positivo, calibrador/ control nivel 5 que es el que contendrá la concentración mayor del metabolito provenientes del fabricante. Con el calibrador niv el 3 el instrumento por espectrofotometría brindara un Δ de absorbancia que es el r esultado de interpre tación con estos el instrumento re aliza el punto de corte para diferenciar resultados positivos de los negativos.

Tomando en cuenta que los calibradores/control, para este estudio son materiales de referencia certificados esto va a tomar una gran importancia al momento de realizar la confirmación y además de ser una ventaja que no va a brindar validez a los resultados.

El método utilizado fue el inferencial el cual se define como aquel cuya metodología se basa en el uso de inferencias estadísticas para determinar la elección del mejor resultado mediante pruebas de hipótesis o toma de decisiones.

3.2 REACTIVOS

Prueba Emit® II Plus utiliza los reactivos contenidos en frascos, estos ya vienen listos para usarse, sin la nece sidad de re constituirlos, los cuales deben mantenerse a un a temperatura de almacenamiento de 2 -8°C (36-46°F), en posición vertical y bien cerrados. Evitando una exposición prolongada a temperaturas superiores a los 32°C [41].

- ✓ Reactivo 1: anticuerpo/sustrato. Anticuerpos monoclonales/policlonales de ratón/carnero contra las diferentes drogas de abuso, albumina sérica bovina, agentes conservantes y estabilizadores.
- ✓ Enzima reactivo 2: droga de abuso marcada con G6PDH (U/ml), tampón Tris, albumina sérica bovina, agentes conservantes y estabilizadores.

- ✓ Calibrador/control Emit®, nivel 0 orina humana, agentes conservantes.
- ✓ Calibrador/control Emit®, nivel 1 orina humana, d-metanfetamina, morfina, agente conservante.
- ✓ Calibrador/control Emit®, nivel 2 orina humana, benzoilecgonina, lormetazepam, metadona, d-metanfetamina, metaculona, morfina, 11-nor- Δ^9 THC-9-COOH, fenciclidina, propoxifeno, secobardital, agente conservante.
- ✓ Calibrador/control Emit®, nivel 3 (contenido listado arriba en el nivel 2).
- ✓ Calibrador/control Emit®, nivel 4 (contenido listado arriba en el nivel 2 con excepción de d-anfetamina y morfina).
- ✓ Calibrador/control Emit®, nivel 5 (contenido listado arriba en el nivel 2) [41].
- ✓ Hidróxido de sodio al 1% V.V
- ✓ Hipoclorito de sodio al 1% V.V
- ✓ Acido clorhídrico al 0.1 N
- ✓ Agua destilada

3.3 MATERIALES E INSTRUMENTO

- ✓ Analizador EMIT Viva “E” con número de serie: 6-7340 marca SIEMENS con el software WinTox® Data Manager
- ✓ Copillas de plástico desechables de 1.0 ml
- ✓ Unidad refrigerante marca SIEMENS
- ✓ Software SPSS versión 15



FIGURA 3.3.1 Representación del instrumento de trabajo analizador EMIT Viva “E”

3.4 PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y PROCEDIMIENTO DE LA VALIDACION

Para este estudio debido a que es una Verificación para los valores establecidos por el fabricante, se utilizaron los calibradores/controles nivel: 0, 3 y 5 que contienen diferentes concentraciones de las drogas de abuso. Estos calibradores se mantuvieron en refrigeración debido a su naturaleza para garantizar su estado funcional.

Al comenzar con el procedimiento, se enlistan los pasos a seguir dentro del método

1. Los calibradores se colocaron en las copillas desechables
2. Se colocaron en el instrumento de trabajo: Analizador EMIT Viva “E”.
3. Se realizó la Verificación intermedia y se corrieron las curvas de calibración, realizando la programación del equipo.
4. Se realizó el análisis de cada muestra para cada calibrador, se realizan las mediciones.
5. Se registraron e imprimieron todos los datos.
6. Teniendo ya todos los datos obtenidos de las mediciones, se realizó el análisis estadístico

A continuación se esquematiza con un diagrama de bloques para facilitar la elaboración del método de trabajo.

3.5 PROCEDIMIENTO PARA VERIFICACIÓN

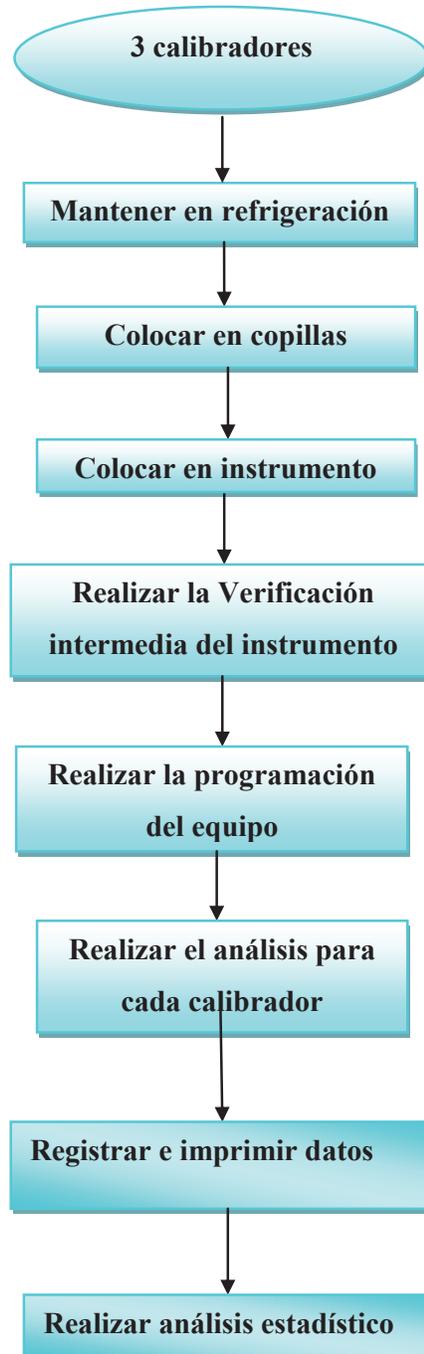


Figura 3.5.1 Procedimiento que se realizó para llevar a cabo la Verificación del método de inmunoensayo enzimático

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de las mediciones a corto y a largo plazo se sometieron a un análisis estadístico, determinándose los estadísticos necesarios para calcular los parámetros requeridos para esta Verificación procedente de la validación del fabricante. Se realizó un análisis estadístico, para determinar si las pruebas a utilizar son adecuadas o no.

Para el caso paramétrico se debe cumplir con las siguientes condiciones, en caso que no se cumplan se determina que la población tiene un comportamiento no paramétrico y se realizan las pruebas adecuadas, dependiendo del comportamiento poblacional.

- Independencia muestral
- Normalidad de la distribución
- Homogeneidad de varianzas

En este trabajo se realizó un estudio estadístico paramétrico, determinado a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software SPSS,

EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD

Para evaluar la exactitud: precisión y veracidad como lo marcan las guías de validación: en este estudio para evaluar la precisión se utilizaron las cartas control para observar si el método está dentro de control, para realizar las cartas de control es necesario hacer diferentes cálculos a los datos de las mediciones obtenidas estos se mencionan a continuación:

Como las cartas control son un tipo de gráfico donde se evaluó el “error” o sesgo los símbolos o colores que utilizaremos son:

- Error o sesgo círculos de color púrpura.
- Línea de la media en color verde al centro del gráfico.
- Límites de control, líneas de color rojo al extremo del gráfico.
- Límites de acción, líneas de color azul entre la media y los límites de control.

El error se determina al restar el valor de las mediciones obtenidas al del valor obtenido por el fabricante, la media es el promedio de todas las mediciones, para determinar los límites de control y de acción, se calcula la desviación estándar D_s para los límites de control se multiplica la desviación estándar por tres y se le suma la media del “error”, para el límite superior, para el límite inferior a la desviación estándar por tres se le resta la media del “error” estos límites de control van a indicar que cuando un punto de color purpura que representan el “error” sobrepasen estas líneas significa que el proceso se ha salido de control y esto se debe a un “error sistemático”. Para los límites de acción se multiplica la desviación estándar por dos y se le suma la media del “error”, para el límite de acción superior r , para el límite de acción inferior se multiplica la desviación estándar por dos y se le resta la media del “error” estos límites de acción van a indicar errores aleatorios cuando algún punto los sobrepase y como su nombre lo indica se debe realizar una acción preventiva o correctiva para no dejar que estos alcancen los límites de control.

El establecimiento de la metodología, permite identificar los métodos y procedimientos a utilizar, los cuales disminuyen la probabilidad de cometer errores que pueden repercutir en los resultados. Esto es debido a que una vez establecida la metodología permite apreciar los pasos críticos que se tuvieron que considerar al realizar la parte experimental.

Establecido el método y procedimiento se continúa con la parte experimental, y al análisis de los resultados, este tema se aborda en el siguiente capítulo donde se describe e interpretan los resultados obtenidos de la parte experimental donde se esquematizan en su mayor parte con gráficas y tablas para su comprensión.

CAPÍTULO IV

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Ahora el presente capítulo en el cual se presentan los resultados, al llevar a cabo la evaluación de los parámetros necesarios que conduzcan a la Verificación adecuada para los metabolitos de las drogas de abuso.

Se evalúa la exactitud del método, al igual que lo realizó el fabricante tal y como lo indica en su Verificación, para evaluar la exactitud se utilizan los parámetros de precisión y veracidad. En cada parámetro se realiza, primero una presentación de resultados y gráficas obtenidas estableciendo los valores que resultan de evaluar los parámetros de desempeño mencionados.

Para realizar una validación adecuada, es necesario llevar a cabo un cálculo apropiado de los resultados para cada uno de los parámetros sujetos a validación que son la base para validar un sistema, es necesario realizar una interpretación adecuada de los resultados obtenidos que lleven a una validación aceptable y confiable.

4.1 EXACTITUD

Para evaluar la exactitud se utiliza la precisión y la veracidad, vamos a utilizar para este caso la ecuación de la diferencia crítica y para la precisión se utilizó la repetibilidad y la reproducibilidad, a continuación se ilustra en la figura 4.1.1 la forma de evaluar la exactitud, se comienza por evaluar la precisión y enseguida la veracidad.

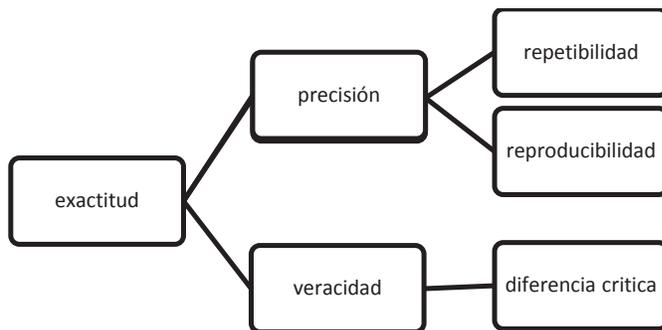


Figura 4.1.1 Diagrama de evaluación de la exactitud.

4.1.1. PRECISIÓN

Grado de concordancia existente entre los resultados de ensayo independientes, obtenidos en condiciones estipuladas [72].

4.1.1.1 REPETIBILIDAD

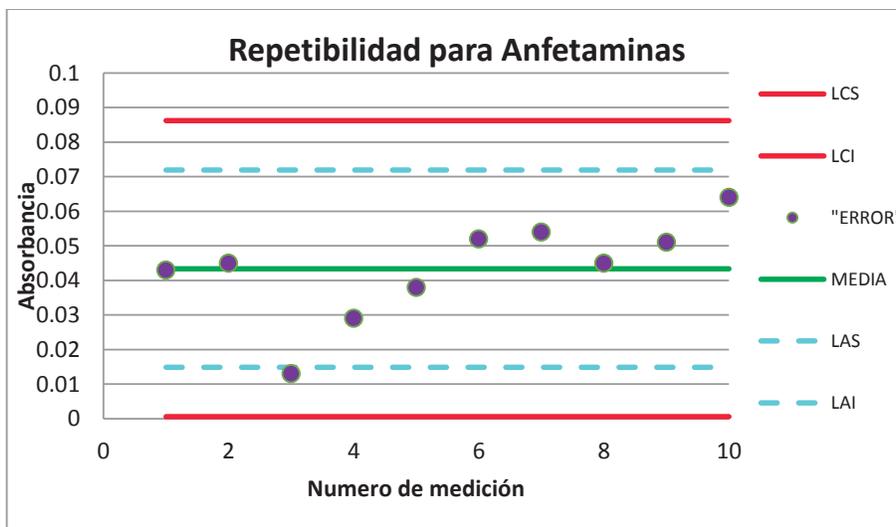
En la tabla 4.1.1.1.1 se muestran los resultados procedentes de 10 días de medición para evaluar la repetibilidad. Los datos mostrados en la tabla corresponden específicamente a los resultados de la medición de la absorbancia para los metabolitos de anfetamina, cocaína, opiáceos y THC contenidos en el calibrador nivel 3 a lo largo de diez días de medición. Se puede observar la consistencia de los valores de absorbancia para cada uno de los metabolitos analizados. Se resalta una diferencia de 0.044 de la medición No. 3 de opiáceos con respecto a la medición 1, siendo la más significativa registrada a lo largo de la prueba.

Tabla 4.1.1.1.1 Delta de absorbancia del calibrador/control nivel 3 para evaluar la repetibilidad de los metabolitos de las drogas de interés.

No.	DÍAS	ANF*	COCA**	OPIA***	THC****
1	25/10/2010	0,476	0,328	0,362	0,354
2	26/10/2010	0,478	0,335	0,37	0,353
3	27/10/2010	0,446	0,342	0,318	0,337
4	28/10/2010	0,462	0,344	0,333	0,343
5	29/10/2010	0,471	0,343	0,333	0,352
6	30/10/2010	0,485	0,345	0,337	0,342
7	31/10/2010	0,487	0,344	0,338	0,345
8	01/10/2010	0,478	0,343	0,337	0,343
9	01/11/2010	0,484	0,344	0,336	0,34
10	02/11/2010	0,497	0,346	0,344	0,344

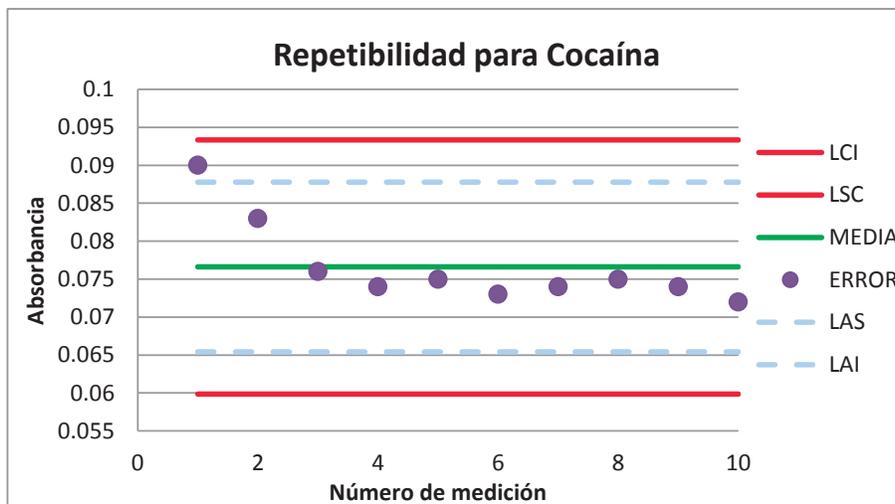
*ANFETAMINAS**COCAINA***DERIVADOS DEL OPIO****TETRAHIDROCANNABINOL

Gráfica 4.1.1.1.1 se muestra la carta control para los metabolitos de las anfetaminas en donde se observa que la mayoría de los puntos que indican el error se encuentran alrededor de la media o cerca de ella y solo el punto tres pasa el límite de acción inferior por lo que se realiza una acción preventiva y a continuación regresa alrededor de la media y sigue así durante la medición.



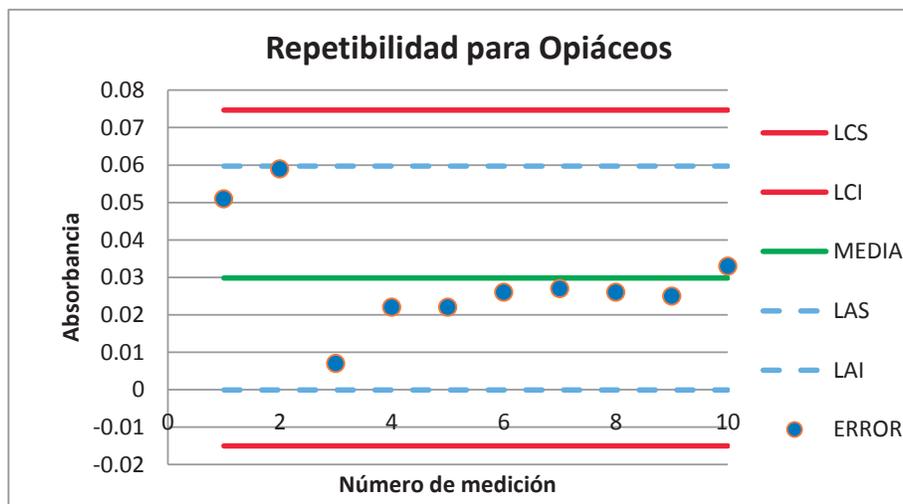
Gráfica 4.1.1.1.1 Repetibilidad para Anfetaminas. Del calibrador/control nivel 3. En donde se gráfica el Δ de absorbancia durante los 10 días de medición.

Gráfica 4.1.1.1.2 carta control para los metabolitos de la cocaína, se muestra la absorbancia obtenida para el control nivel 3 durante los 10 días de medición. En la cual se observa que solo la primera medición se encuentra por encima del límite de acción superior, pero en las siguientes mediciones se observa que oscilan alrededor de la media.



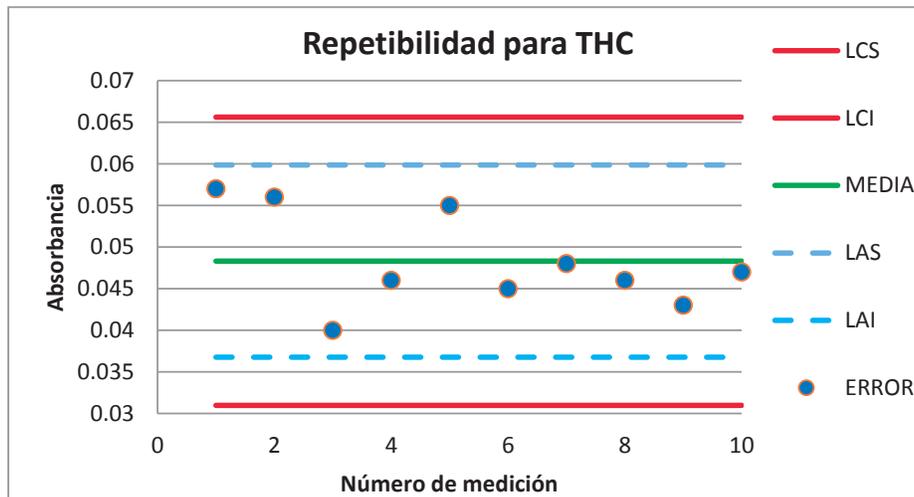
Gráfica 4.1.1.1.2. Repetibilidad para metabolitos de Cocaína. Del calibrador/control nivel 3. En donde se gráfica el Δ de absorbancia durante los 10 días de la medición.

Gráfica 4.1.1.1.3 para los metabolitos de los derivados opiáceos en donde la mayor significancia se muestra en el punto de medición dos y que el punto de la medición toca el límite de acción superior pero en la siguiente medición se observa que desciende un poco más cerca de la media en las siguientes mediciones se observa que oscilan alrededor de la media y así se mantienen a lo largo del proceso.



Gráfica 4.1.1.1.3. Repetibilidad para Opiáceos. Del calibrador/control nivel 3. En donde se gráfica el Δ de absorbancia durante los 10 días de la medición.

Gráfico 4.1.1.1.4 para THC en donde no se observa a simple vista alguna anomalidad, y todos los puntos se encuentran cerca de la media y ninguno de ellos toca los límites.



Gráfica 4.1.1.1.4. Repetibilidad para THC. Del calibrador/control nivel 3. En donde se gráfica el Δ de absorbancia durante los 10 días de la medición.

4.1.1.2 REPRODUCIBILIDAD

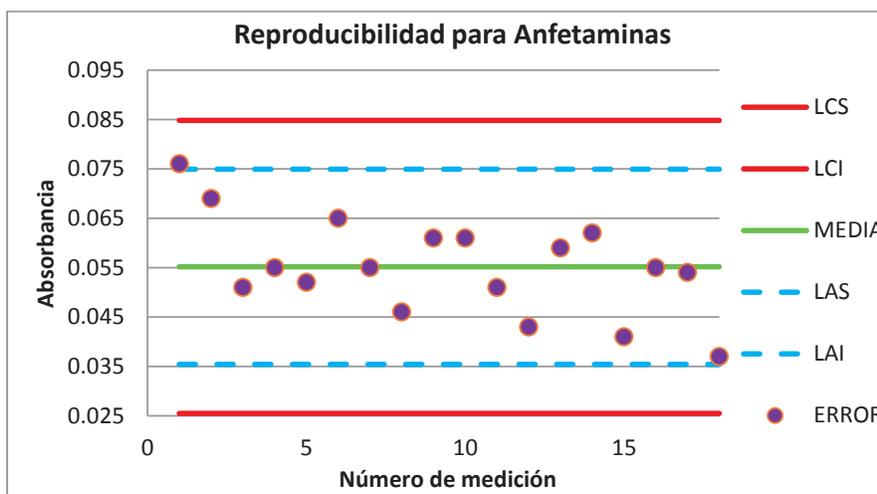
En la tabla 4.1.1.2.1 se muestran los resultados procedentes de varios meses de medición y por diferentes analistas, para evaluar la reproducibilidad. Los datos especificados en la tabla corresponden a los resultados para los metabolitos de Anfetaminas, Cocaína, Opiáceos y *Cannabis* contenidos en el calibrador nivel 3 obtenidos del promedio de las mediciones de 7 meses y realizadas por diferentes químicos analistas. Se puede observar la consistencia de los valores de absorbancia para cada uno de los metabolitos analizados.

Tabla 4.1.1.2.1 Delta de absorbancia del calibrador/ control nivel 3 para evaluar la reproducibilidad de lo metabolitos de las drogas de interés.					
No.	FECHA	ANF*	COCA**	OPIA***	THC****
1	16/07/2010	0,509	0,365	0,358	0,328
2	02/08/2010	0,502	0,361	0,377	0,346
3	30/08/2010	0,484	0,355	0,345	0,367
4	06/09/2010	0,488	0,35	0,341	0,367
5	22/09/2010	0,485	0,34	0,351	0,329
6	29/09/2010	0,498	0,338	0,352	0,363
7	07/10/2010	0,488	0,343	0,348	0,363
8	15/10/2010	0,479	0,349	0,342	0,363
9	08/11/2010	0,494	0,351	0,352	0,378
10	17/11/2010	0,494	0,354	0,338	0,374
11	25/11/2010	0,484	0,356	0,341	0,374
12	02/12/2010	0,476	0,375	0,361	0,352

13	08/12/2010	0,492	0,362	0,342	0,369
14	22/12/2010	0,495	0,313	0,364	0,331
15	06/01/2011	0,474	0,352	0,334	0,315
16	17/01/2011	0,488	0,363	0,334	0,341
17	24/01/2011	0,487	0,376	0,355	0,376
18	31/01/2011	0,47	0,366	0,362	0,378

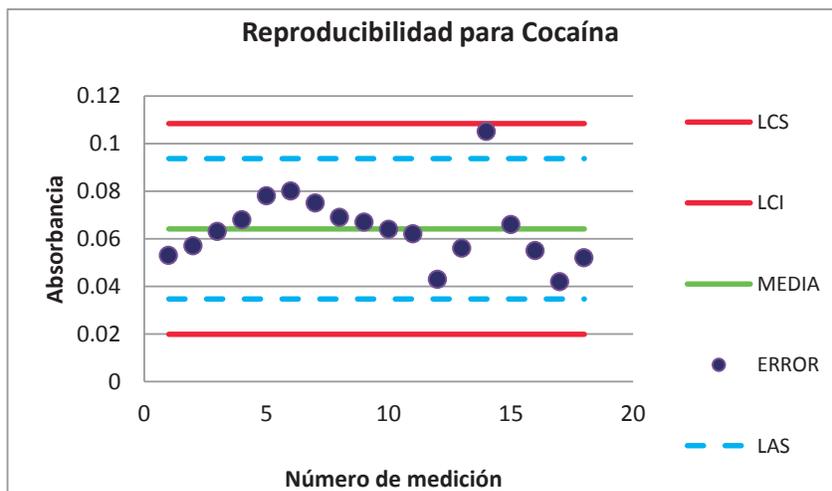
*ANFETAMINAS**COCAINA***DERIVADOS DEL OPIO****TETRAHIDROCANNABINOL

En la gráfica 4.1.1.2.1 para los metabolitos de las anfetaminas. En donde se observa que la primera medición se brepasa el límite de acción superior, pero en la siguiente medición se obser va que van regresando cerca o alred edor de la me dia, y así se mantiene durante todo el proceso.



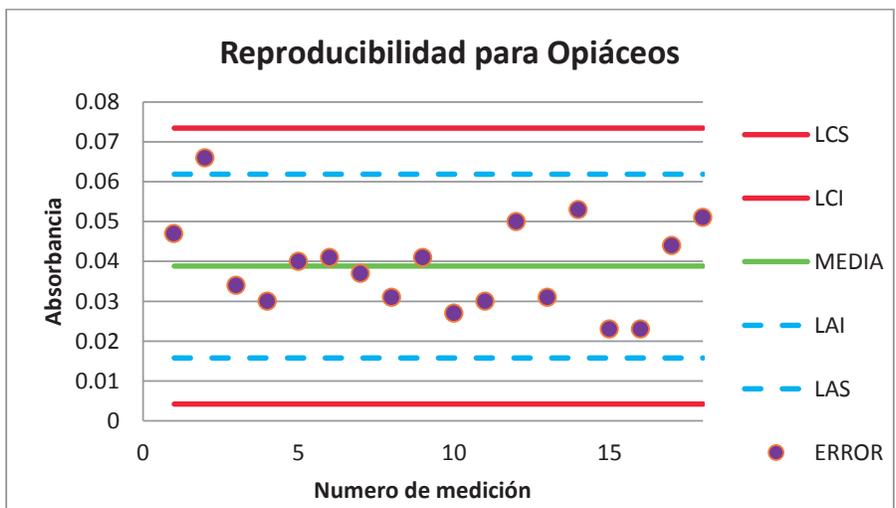
Gráfica 4.1.1.2.1. Reproducibilidad para anfetaminas. Del calibrador/control nivel 3 en donde se gráfica el Δ de absorbancia de la medición.

Gráfica 4.1.1.2.2 para los metabolitos de coc aína en donde se observa una tendencia al principio del gráfico y un punto se acerca al límite de control superior pero en seguida se observa que las mediciones están cerca de la media.



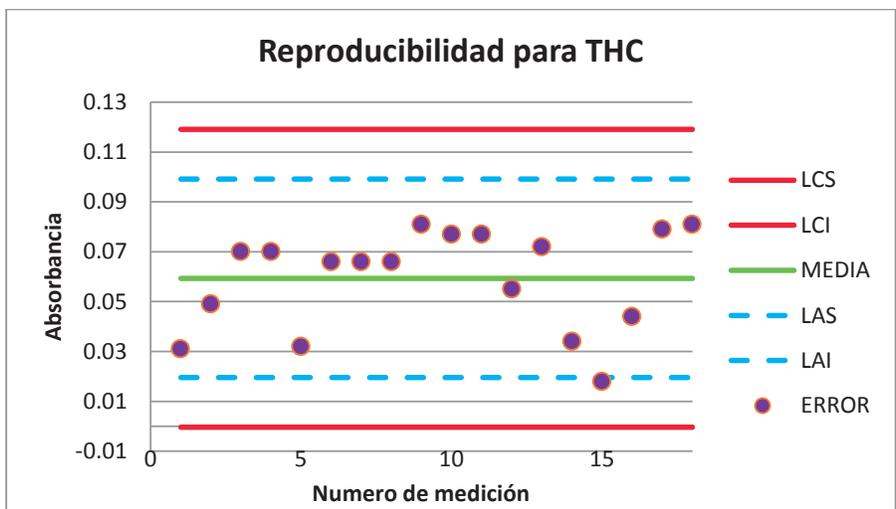
Gráfica 4.1.1.2.2. Reproducibilidad para metabolitos de cocaína. Del calibrador/control nivel 3 en donde se gráfica el Δ de absorbancia de la medición.

Gráfica 4.1.1.2.3 Para derivados de los opiáceos en donde se observa que lo más relevante es el segundo punto de medición que sobrepasa el límite de acción superior de ahí en adelante todos los demás puntos de medición se encuentran cerca o alrededor de la media.



Gráfica 4.1.1.2.3. Reproducibilidad para opiáceos. Del calibrador/control nivel 3 en donde se gráfica el Δ de absorbancia de la medición.

En la gráfica 4.1.1.2.4 se observa el gráfico de control para los metabolitos del *Cannabis* en donde la mayoría de los puntos se encuentran alrededor de la media a excepción de un punto de medición que sobrepasa el límite de acción inferior.



Gráfica 4.1.1.2.4. Reproducibilidad para THC. Del calibrador/control nivel 3 en donde se gráfica el Δ de absorbancia de la medición.

4.1.2 VERACIDAD

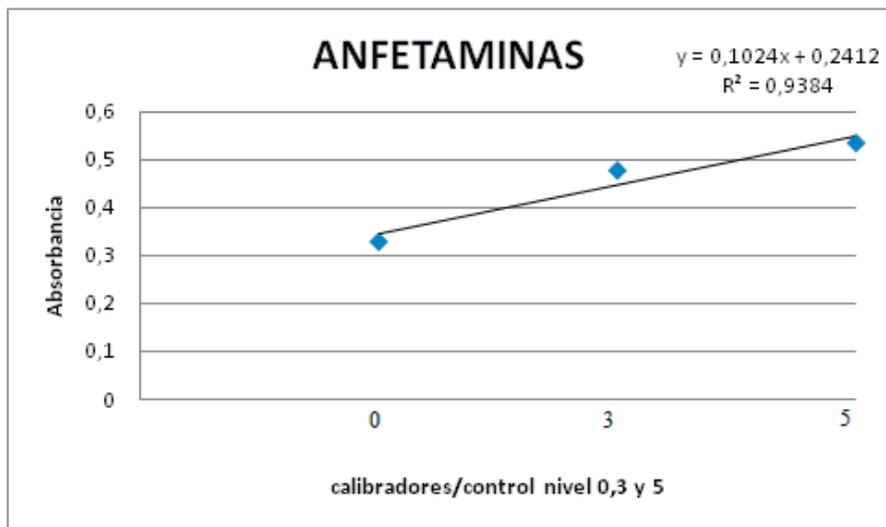
Para evaluar la veracidad se utiliza la ecuación de la diferencia crítica y vamos a crear las hipótesis tanto nula como alternativa para esto: si la diferencia crítica es mayor que la diferencia obtenida la veracidad es adecuada y para representarlo utilizamos las campanas de gauss, para utilizar la ecuación de la diferencia crítica se necesita evaluar la linealidad para de ahí sacar la precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad la cual se obtiene de utilizar la ecuación de la recta por el promedio de las mediciones de absorbancia de los calibradores niveles 0, 3 y 5 para cada metabolito que son: σ_R (precisión en condiciones de reproducibilidad.) y σ_r (precisión en condiciones de repetibilidad.)

4.1.2.1. PRECISIÓN EN CONDICIONES DE REPETIBILIDAD

En la tabla 4.1.2.1.1 se muestran los Δ de absorbancia para los tres calibradores utilizados, que son los niveles: 0, 3 y 5 obsérvese de forma general que al aumentar el nivel de cada calibrador va aumentando de manera proporcional la absorbancia

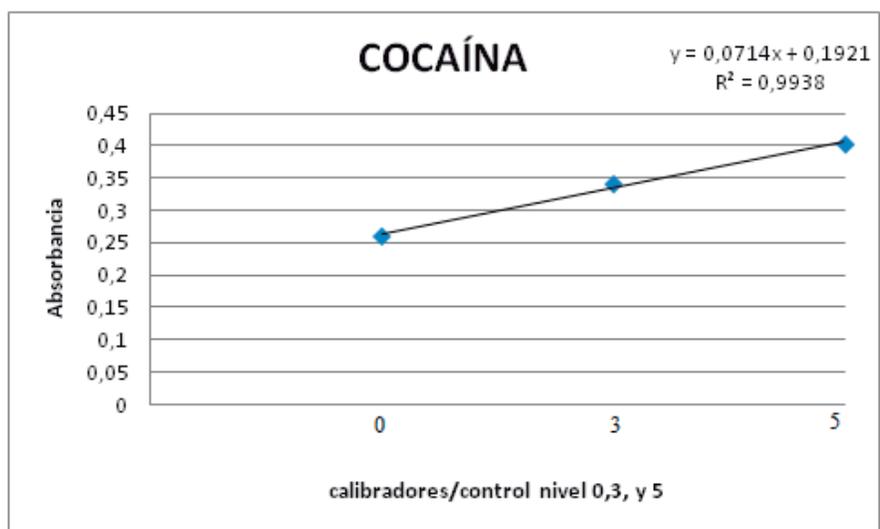
Tabla 4.1.2.1.1 Delta de absorbancia para los calibradores/control para evaluar la linealidad y la precisión en condiciones de repetibilidad			
	Calibrador 0	Calibrador 3	Calibrador 5
ANFETAMINAS	0,3285	0,4764	0,5334
COCAÍNA	0,2602	0,3414	0,403
OPIACEOS	0,2111	0,3408	0,3861
THC	0,2903	0,3453	0,477

Gráfica 4.1.2.1.1 se presenta la linealidad para las anfetaminas en donde se observa un coeficiente de correlación del 0,9384



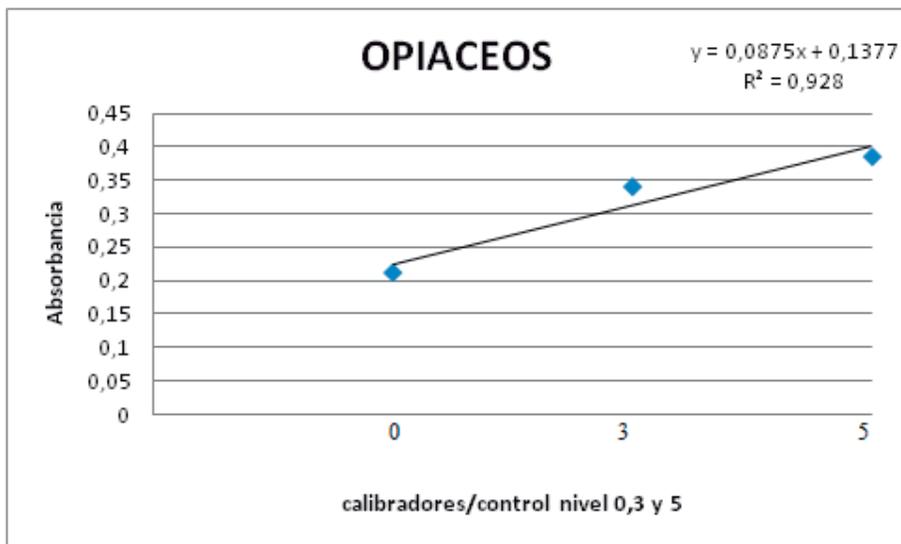
Gráfica 4.1.2.1.1 Linealidad para Anfetaminas. En el eje de las “y” se gráfica la absorbancia y para el eje de las “x” los tres calibradores utilizados.

Gráfica 4.1.2.1.2 Se observa la linealidad para los metabolitos de la cocaína en donde coinciden los tres puntos y el coeficiente de relación es de 0,9938.



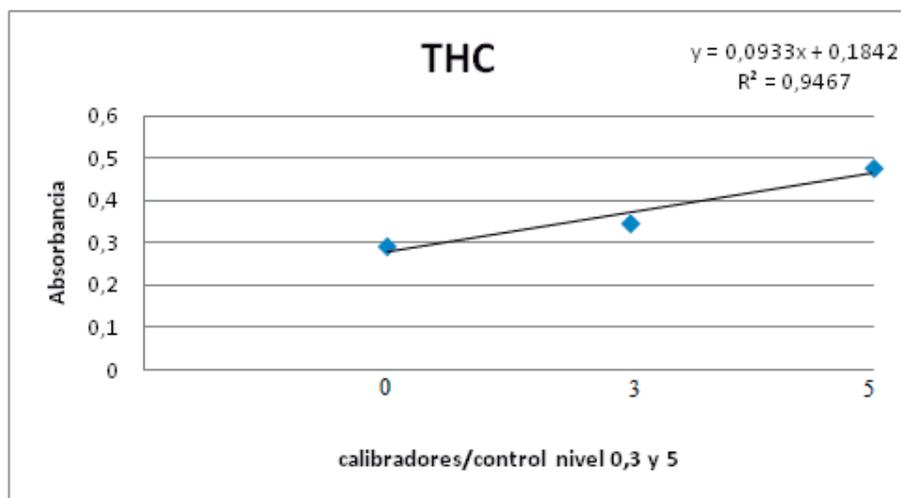
Gráfica 4.1.2.1.2 Linealidad para cocaína. En el eje de las “y” se gráfica la absorbancia y en el eje de las “x” los tres calibradores utilizados

Gráfica 4.1.2.1.3. Se observa la linealidad para los metabolitos de los opiáceos y tiene un coeficiente de correlación de 0,928



Gráfica 4.1.2.1.3. Linealidad para opiáceos. En el eje de las “y” se gráfica la absorbancia y en el eje de las “x” los tres calibradores utilizados.

Gráfica 4.1.2.1.4 donde se observa la linealidad para los metabolitos de *Cannabis* y el coeficiente de correlación es de 0,9467



Gráfica 4.1.2.1.4. Linealidad para THC. En el eje de las “y” se gráfica la absorbancia y en el eje de las “x” los calibradores utilizados.

Ya teniendo las ecuaciones provenientes de la ecuación de la recta, se multiplica la media de las absorbancia y se obtiene la precisión en condiciones de repetibilidad que es la que ocupamos para utilizar la ecuación de la diferencia crítica.

En la tabla 4.1.2.1.2 se muestra la precisión en condiciones de repetibilidad en donde se observa que la precisión de las anfetaminas es la mayor y la precisión de los opiáceos es la menor.

Tabla 4.1.2.1.2 Precisión en condiciones de repetibilidad.				
Metabolitos	Anfetaminas	Cocaína	Opiáceos	THC
Precisión en condiciones de repetibilidad	0,16373868	0,0899589	0,07674816	0,09585528

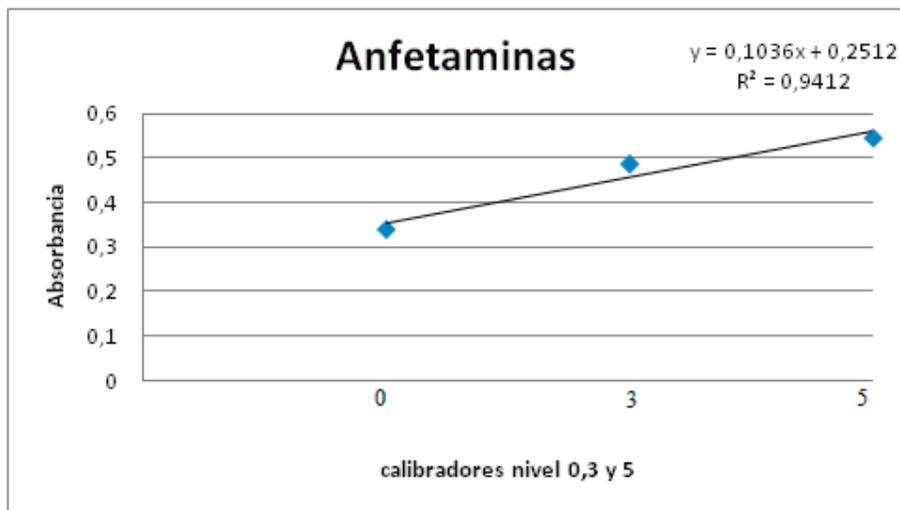
Al igual que en la precisión en condiciones de repetibilidad para la precisión en condiciones de reproducibilidad se evalúa la linealidad para obtener la ecuación de la recta.

4.1.2.2 PRECISIÓN EN CONDICIONES DE REPRODUCIBILIDAD.

En la tabla 4.1.2.2.1 se muestran los resultados obtenidos en deltas de absorbancia para los calibradores utilizados, nivel 0, 3 y 5, conforme va aumentando el nivel es directamente proporcional va aumentando la absorbancia.

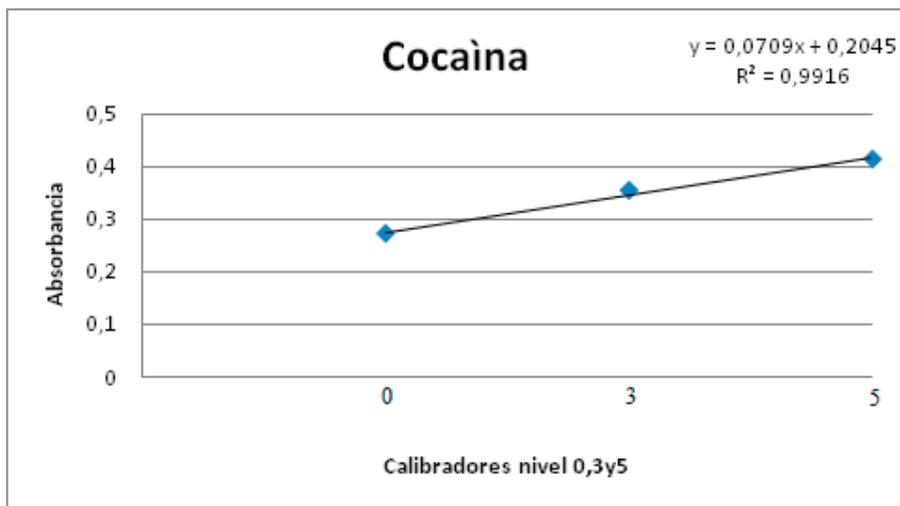
Tabla 4.1.2.2.1 Delta de absorbancia de los calibradores/control para evaluar la linealidad de la precisión en condiciones de reproducibilidad.			
	Calibrador 0	Calibrador 3	Calibrador 5
Anfetaminas	0,3397	0,4881	0,5468
Cocaína	0,2716	0,3538	0,4133
Opiáceos	0,2148	0,3498	0,3948
THC	0,3051	0,3563	0,4874

En la gráfica 4.1.2.2.1 se observa la linealidad para los metabolitos de las anfetaminas, y un coeficiente de correlación de 0,9412.



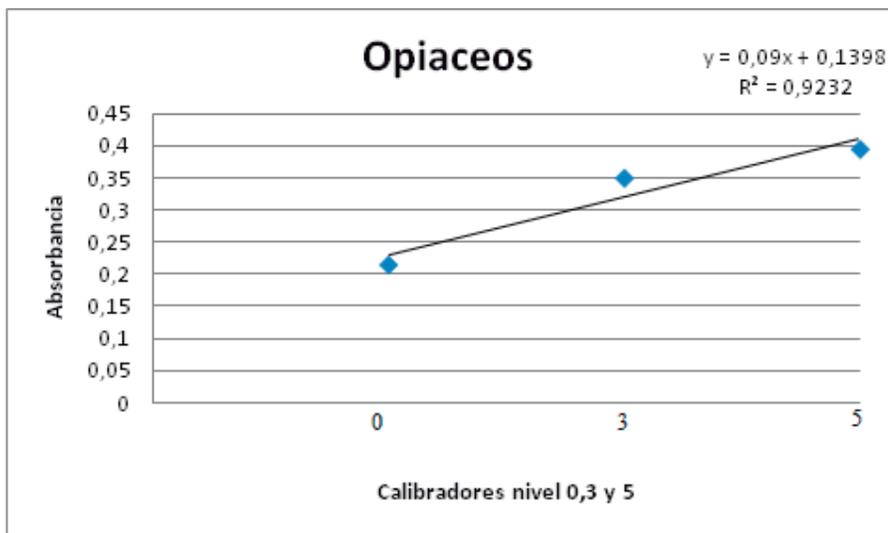
Gráfica 4.1.2.2.1. Linealidad para anfetaminas. En el eje de las “y” se gráfica la absorbancia y en el eje de las “x” los tres calibradores utilizados.

Gráfica 4.1.2.2.2 se observa la linealidad para los metabolitos de cocaína, donde se observa que tiene un buen comportamiento, los tres puntos tocan la línea y presenta un coeficiente de correlación de 0,9916.



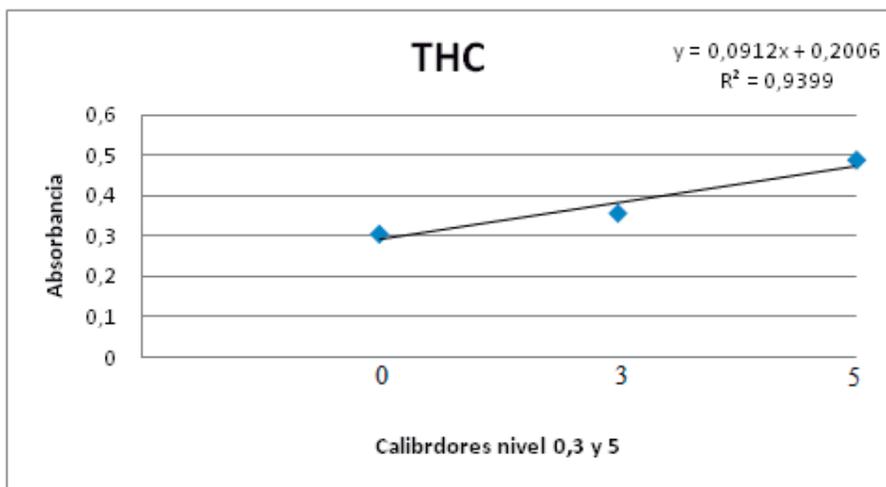
Gráfica 4.1.2.2.2 Linealidad para cocaína. En el eje de las “y” se gráfica la absorbancia y en el eje de la “x” los tres calibradores utilizados.

Gráfica 4.1.2.2.3 se observa la linealidad para los metabolitos de los opiáceos y presenta un coeficiente de correlación de 0,9232.



Gráfica 4.1.2.2.3. Linealidad para opiáceos. En el eje de las “y” se gráfica la absorbancia y en el eje de la “x” los tres calibradores utilizados.

Gráfico 4.1.2.2.4 en donde se observa la linealidad para los metabolitos de *Cannabis*, y presenta un coeficiente de correlación de 0,9399.



Gráfica 4.1.2.2.4. Linealidad para THC. En el eje de las “y” se gráfica la absorbancia y en el eje de las “x” los tres calibradores utilizados.

Al igual que en la precisión en condiciones de repetibilidad, teniendo las ecuaciones provenientes de la ecuación de la recta, se multiplica la media de las absorbancias y se

Obtiene la precisión en condiciones de reproducibilidad que es la que ocupamos para utilizar la ecuación de la diferencia crítica

En la tabla 4.1.2.2.2 se muestra la precisión en condiciones de reproducibilidad en donde se observa de nuevo que la precisión de las anfetaminas es la mayor y ahora la precisión menor es la de los opiáceos.

Tabla 4.1.2.2.2 Precisión en condiciones de reproducibilidad				
Metabolitos	Anfetaminas	Cocaína	Opiáceos	THC
Precisión en condiciones de reproducibilidad	0,17320153	0,0974457	0,0803917	0,10397808

Ahora que ya tenemos la precisión para cada uno de los metabolitos tanto en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad donde utilizamos la ecuación de la diferencia crítica que se menciona en el capítulo 3 pero antes tenemos que crear las hipótesis de trabajo, una hipótesis nula y una alternativa, al evaluar la diferencia crítica sabremos cual hipótesis aceptar y cual descartar.

4.1.2.3 PRUEBA DE DIFERENCIA CRÍTICA PARA LA VERACIDAD

H_0 : Los datos obtenidos en el laboratorio de Química y Genética Forense son reproducibles a los obtenidos por el fabricante.

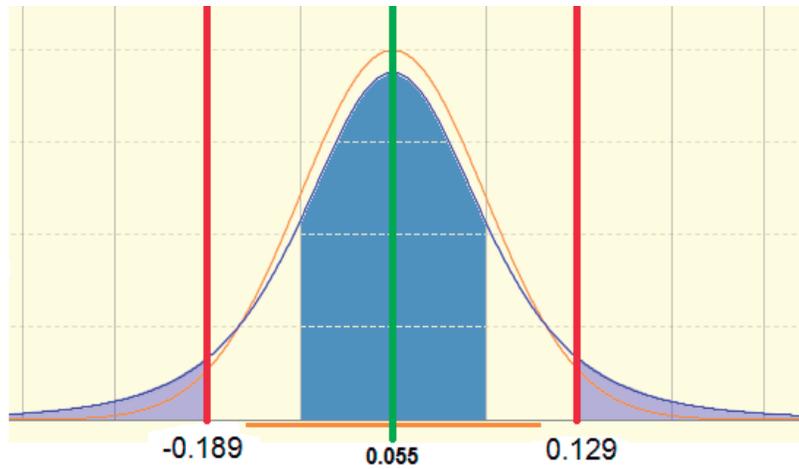
H_1 : Los datos obtenidos en el laboratorio de Química y Genética Forense no son reproducibles a los obtenidos por el fabricante.

En la tabla 4.1.2.3.1 se muestran los valores obtenidos, el valor del fabricante, así como sus diferencias como se puede observar la diferencia es más pequeña que la diferencia crítica.

4.1.2.3.1. Valores de las medias obtenidas, valores provenientes del fabricante, la diferencia y la diferencia crítica.				
Metabolitos	ANFETAMINAS	COCAÍNA	OPIACEOS	THC
Media de los valores obtenidos	0,482	0,353	0,344	0,350
Valor del fabricante	0,433	0,418	0,311	0,297
Diferencia	-0.043	0.065	-0.033	-0.053
Diferencia crítica	0,108	0,072	0,046	0,077

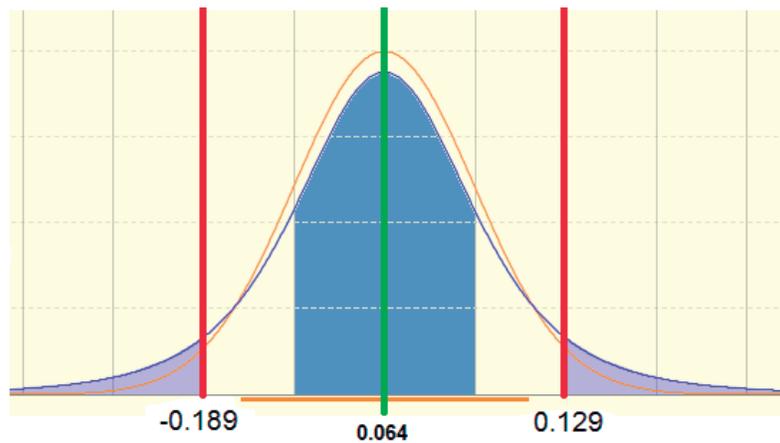
Se observa en la tabla 4.1.2.3.1 la diferencia crítica es mayor que la diferencia obtenida y se acepta la hipótesis nula. Para comprender de forma visual el mejor comportamiento de la veracidad se utilizan gráficas utilizando una campana de gauss para entender mejor el por qué se acepta la hipótesis nula. En donde se evalúan los valores del fabricante contra los valores obtenidos y la diferencia entre estos así como la diferencia crítica.

Gráfica 4.1.2.3.1 se presenta la veracidad para los metabolitos de las anfetaminas en donde se puede observar que la diferencia crítica es mayor que la diferencia y se acepta la hipótesis nula.



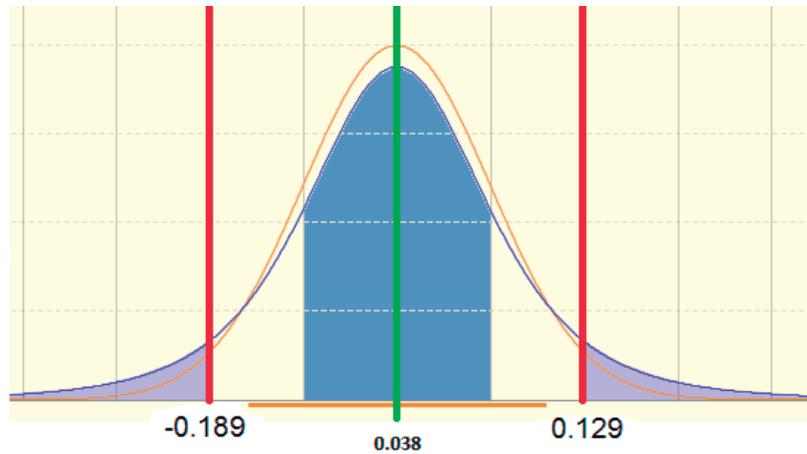
4.1.2.3.1 Veracidad para anfetaminas. En donde se graficaron los resultados utilizando las diferencias, el valor obtenido y el valor del fabricante

Gráfica 4.1.2.3.2. Se presenta la veracidad para los metabolitos de la cocaína en donde se observa que el valor de la diferencia es menor que la diferencia crítica y por tanto se acepta la hipótesis nula.



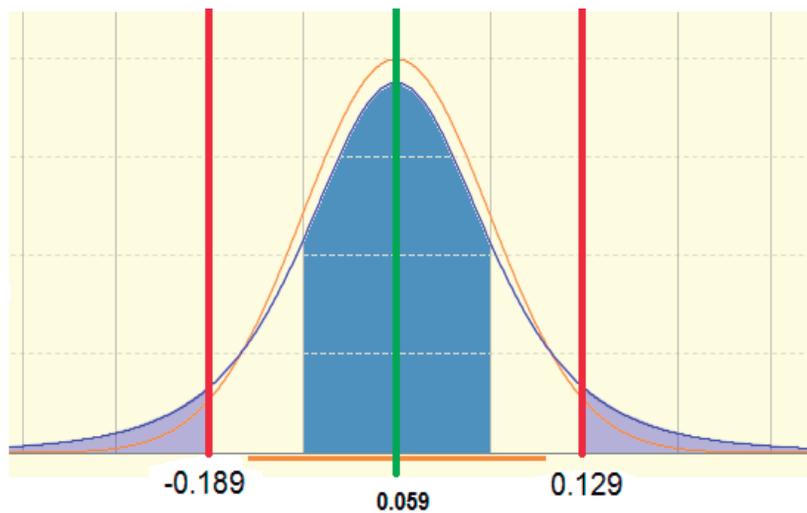
4.1.2.3.2. Veracidad para cocaína. En donde se muestran los resultados utilizando los valores de las diferencias, el valor obtenido y el valor del fabricante.

Gráfico 4.1.2.3.3 se presenta la veracidad para los metabolitos de los derivados opiáceos en donde se observa que la diferencia crítica es mayor que la diferencia y se acepta la hipótesis nula.



4.1.2.3.3. Veracidad para opiáceos. En donde se muestran los resultados utilizando las diferencias, el valor obtenido y el valor del fabricante.

Gráfica 4.1.2.3.4. Se presenta la veracidad para los metabolitos del *Cannabis* en donde se observa que el valor de la diferencia es menor que el de la diferencia crítica y por tanto se acepta la hipótesis nula



4.1.2.3.4. Veracidad para THC. En donde se muestran los resultados utilizando el valor de las diferencias, el valor obtenido y el valor del fabricante.

CAPÍTULO V

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

En el capítulo anterior se presentaron los resultados, ahora recurrimos al presente capítulo para dar una interpretación adecuada los valores obtenidos durante el proceso de experimentación y de esta manera ir concluyendo con todo el proceso de validación realizado en los tiempos mencionados, así mismo en este capítulo mencionamos, si pudimos cumplir con la hipótesis planteada al principio de esta tesis o no.

Iniciando por interpretar la repetibilidad, enseguida la reproducibilidad para con estos parámetros interpretar la precisión, para la veracidad vamos a interpretar los resultados de la precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad y la ecuación de la diferencia crítica.

5.1. INTERPRETACION DE RESULTADOS PARA REPETIBILIDAD

La repetibilidad para los metabolitos de las anfetaminas presenta un comportamiento adecuado. Como lo marcan las guías de validación, la repetibilidad es igual al grado de concordancia entre resultados de mediciones sucesivas. El comportamiento de los datos obtenidos indica que existe una repetibilidad adecuada y que en su mayoría se encuentran dentro de los límites de acción, sin embargo los valores obtenidos por encima del límite de acción superior pudieran ser originados por un “error aleatorio” por lo que se realiza una acción preventiva. Por tanto se demuestra que las mediciones de las anfetaminas presenta una buena repetibilidad y la mayoría de los puntos no exceden de los límites de control.

En la repetibilidad para los metabolitos de la cocaína la primera medición se encuentra fuera de él límite superior de acción, esto se puede deber a un cambio en la molécula, como lo marcan las referencias utilizadas esto puede deberse por las siguientes causas. El mensurando puede existir en la muestra en más de una forma, tal como: ligado o desligado, inorgánico u orgánometálico, o en diferentes estados de oxidación o reducción, etc. Por lo tanto esta medición se puede observar fuera del límite de acción superior debido a esto y en las siguientes mediciones se encuentran dentro de los límites o cerca de la media y su repetibilidad es adecuada.

Para los metabolitos de los opioides se observa que las mediciones se encuentran dentro de los límites de acción y la mayoría alrededor de la media. Su repetibilidad es adecuada y el grado de concordancia es elevado.

Para los metabolitos de *Cannabis* la repetibilidad es adecuada ya que todas las mediciones están dentro de los límites de acción y alrededor de la media.

Por todo lo mencionado se puede decir que el método tiene una buena repetibilidad y que nunca ninguna medición se sale de los límites de control marcados para cada metabolito y las mediciones que han tocado los límites de acción han regresado alrededor de la media en las siguientes mediciones. Por lo que se observa que el proceso se encuentra dentro de control.

5.2. INTERPRETACION DE RESULTADOS PARA REPRODUCIBILIDAD

En el laboratorio de Química Forense del estado de Michoacán para evaluar la reproducibilidad se realizan las mediciones en un lapso de tiempo más largo.

La reproducibilidad para los metabolitos de las anfetaminas el primer punto se encuentra un poco por encima del límite de acción superior como ya se menciona en la repetibilidad esto puede deberse a la molécula, que no solo se encuentra en forma del metabolito buscado dentro de la muestra y puede sufrir variaciones debido a su labilidad, sin embargo los demás puntos se encuentran dentro de los límites de acción y cerca de la media por lo que se presenta una buena reproducibilidad.

La reproducibilidad de los metabolitos de la cocaína en este gráfico se puede observar al principio errores por armónicos estos se presentan en el gráfico como una tendencia de puntos en forma ascendente y después en forma descendente esto puede deberse a varias causas como por ejemplo un tiempo prolongado de almacenamiento u otra causa puede ser el cambio en el lote de reactivo esto puede ser más lógico porque las mediciones se observan que después de los errores por armónicos regresan alrededor de la media, un punto toca el límite de control superior esto puede deberse a un “error aleatorio” pero dentro de todo esto el proceso se encuentra dentro de control.

Reproducibilidad de los metabolitos para los opiáceos en donde se observa que el primer punto se encuentra cerca de la media pero el segundo punto sobre pasa el límite de acción superior por lo que se le puede atribuir a un “error aleatorio”, el siguiente punto se desplaza cerca de la media y así continúan los demás puntos y ninguno de ellos sobrepasa los límites de acción por lo que se le puede atribuir una buena reproducibilidad.

La reproducibilidad para los metabolitos de *Cannabis* en esta gráfica la mayoría de los puntos se encuentran cerca de la media y dentro de los límites de acción a excepción del punto quince que sobrepasa un poco el límite de acción inferior se le atribuye a un “error aleatorio” pero por lo demás se presenta una buena reproducibilidad.

5.3. CONCLUSIÓN DE LA PRUEBA DE PRECISIÓN

El presentar las cartas control sirve para observar si tenemos “errores aleatorios” y “errores sistemáticos”, esta herramienta sirve para darnos cuenta si el proceso está fuera de control, esto sería si algún punto sobrepasa los límites de control, por lo que se observa en las cartas de control tanto para repetibilidad como reproducibilidad ningún punto pasa estos límites por lo que se puede decir que el proceso presenta una buena precisión.

5.4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS PARA LA LINEALIDAD DE LAS MEDICIONES PROVENIENTES DE LA REPETIBILIDAD

Para evaluar la linealidad, la gráfica resultante fue lineal, con un coeficiente de correlación elevado el cual permite estimar la relación entre dos propiedades y de esta manera, si los puntos experimentales siguen una función lineal. Como ya se menciona para este estudio la importancia recae sobre la ecuación de la recta utilizada para obtener las precisiones tanto de repetibilidad como reproducibilidad

La linealidad para los metabolitos de cocaína, es la única que cumple con estas condiciones, para los demás metabolitos esto no se cumple, esto se puede deber a que como solo se están evaluando 3 puntos y deberían cuando menos ser 5, otro factor que influye al evaluar la linealidad es la estabilidad de los calibradores, aunque para este caso lo que nos interesa es obtener la ecuación de la recta para poder utilizar la ecuación de la diferencia crítica además de que el método evaluado es cualitativo.

5.5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS PARA LA LINEALIDAD PROVENIENTES DE LAS MEDICIONES DE LA REPRODUCIBILIDAD.

Al evaluar la linealidad proveniente de los resultados de la reproducibilidad se observa que son semejantes a la linealidad de los resultados provenientes de los datos de repetibilidad esto es debido a que se utilizaron los mismos datos y solo se agregan los datos de otras mediciones de meses anteriores para recordar esto se pueden observar las tablas en donde se presentaron los Deltas de absorbancia obtenidas para repetibilidad y reproducibilidad. De manera general se puede decir que la linealidad para ambos es

buena para los metabolitos de cocaína y que al graficar la línea de tendencia los tres calibradores se agrupan cerca de ella, y para los demás metabolitos esto no se cumple.

5.6. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS PARA LA VERACIDAD

Tal como lo indica la definición de la veracidad evaluamos el grado de coincidencia entre el valor proveniente del fabricante y el valor obtenido de las mediciones.

Veracidad para cocaína. Al igual que en la veracidad para anfetaminas se observa que el valor obtenido es cercano al valor obtenido por el fabricante y su diferencia es mínima, comparándola con la diferencia crítica esta es menor por lo que se acepta la hipótesis nula.

Veracidad para opiáceos. De todos los metabolitos analizados el de los opiáceos es el que se observa tiene la diferencia más pequeña y su veracidad es la mayor.

Veracidad para THC. Al igual que todos los metabolitos analizados la veracidad de THC cumple con la hipótesis nula y su veracidad es buena y se aproxima al valor obtenido por el fabricante.

Adicional a estos parámetros analizados se realiza el control de calidad interno al evaluar la temperatura para los calibradores

Como necesidad de la NMX-EC-17025-IMNC-2006 se desarrolla la Verificación de la técnica para la detección de los metabolitos de las drogas de abuso, la cual le da confianza al usuario que los resultados han sido validos por el respaldo de la Verificación y el control de calidad, al obtener en todos los parámetros resultados cercanos a los obtenidos por el fabricante obtenemos la confirmación de la técnica. Por todo lo antes mencionado podemos decir que la hipótesis planteada al comienzo de esta tesis se cumple.

CAPÍTULO VI: TRABAJO A FUTURO

El propósito de este capítulo es presentar los principales trabajos que se pueden realizar para complementar esta investigación acerca de la Verificación proveniente del fabricante y especialmente en los metabolitos de las drogas de abuso, basados en los resultados obtenidos por medio del presente trabajo.

El hablar de los metabolitos de las drogas de abuso es un tema demasiado extenso en la actualidad el consumo de estas sustancias es considerado un problema de salud pública, por lo que el detectar los metabolitos de una forma adecuada, por los métodos que se tienen al alcance de forma económica y eficazmente para las necesidades del laboratorio de química forense y sus usuarios.

Por tal motivo se llevó a cabo este estudio de la Verificación del método de inmunoensayo enzimático de tipo competitivo de acuerdo a la validación recomendada por el proveedor para evaluar el comportamiento y establecer el desempeño que este método presenta para los metabolitos de las drogas de abuso.

Con la Verificación para los metabolitos de las drogas de abuso de mayor consumo en el estado se abre la puerta a proyectos futuros que aporten un conocimiento completo sobre este tema. Debido a esto en el presente capítulo se establecerán los principales proyectos que se pudieran derivar de este trabajo, de manera que se tenga un estudio más completo alrededor del tema principal.

6.1 Estudios propuestos que se pudieran derivar de esta investigación.

Con el presente trabajo se dejan los parámetros establecidos para que, la Verificación de los metabolitos de drogas de abuso como anfetaminas, cocaína, opiáceos y Cannabis que son las de mayor abuso en el estado de Michoacán sea una plataforma en estudios posteriores. Entre ellos se puede derivar algunos como los siguientes:

- Llevar a cabo una Verificación de las demás drogas de abuso que puede detectar el instrumento como lo son las benzodiazepinas, los barbitúricos así como el etanol pero en condiciones de medición controladas, temperatura y humedad relativa. Se podría decir que se trabajó en condiciones controladas debido a que estas condiciones no tuvieron variaciones grandes durante la medición y en la mayoría de las veces se mantuvieron constantes, aun así es necesario verificar que esas variaciones pequeñas no afectan la respuesta de medición y en consecuencia la Validación.
- Generar un protocolo de comparación inter-laboratorios o ensayo de aptitud técnica
- Debido a que se determinaron los parámetros de desempeño del método solo con tres calibradores/control, se propone si se tiene la posibilidad de utilizar todos los calibradores para garantizar la validación de forma adecuada.
- Se propone también realizar un estudio de estabilidad para los calibradores/control que garantice la estabilidad de los calibradores en las condiciones ambientales a diferentes variaciones. Esto es necesario para validar el método, debido a que son los materiales de referencia utilizados.
- Extender de manera más cercana esta Verificación a la realizada por el proveedor para garantizar los resultados del laboratorio.

GLOSARIO DE TÉRMINOS UTILIZADOS

(Basado en el vocabulario internacional de metrología) [73]

Calibración: Operación que bajo condiciones especificadas establece, en una primera etapa, una relación entre los valores y sus Incertidumbres de medida asociadas obtenidas a partir de los patrones de medida y las correspondientes indicaciones con sus Incertidumbres asociadas y, en una segunda etapa, utiliza esta información para establecer una relación que permita obtener un resultado de medida a partir de una indicación.

Condiciones de Precisión intermedia: Condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medición, el mismo lugar y mediciones repetidas del mismo objeto u objetos similares durante un periodo amplio de tiempo, pero que pueda incluir otras condiciones que involucren variaciones.

Condiciones de repetibilidad: Condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de objetos similares en un periodo de tiempo corto.

Condiciones de reproducibilidad: Condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye diferentes lugares, operadores, sistema de medida y mediciones repetidas de los mismo objetos u objetos similares.

Curva de calibración: Expresión de la relación entre una indicación y el valor medido correspondiente.

Desviación estándar de repetibilidad: Es la desviación estándar obtenida a partir de un número dado de determinaciones bajo condiciones de repetibilidad, es decir, es una medida de la dispersión de la distribución de los resultados de una prueba obtenidos bajo condiciones de repetibilidad.

Error aleatorio: Componente del error de medición que, en mediciones repetidas varía de manera impredecible.

Error de medición: Diferencia entre un valor medido de una magnitud y un valor de referencia.

Error sistemático: Componente del error de medición que, en mediciones repetidas permanece constante o varía de manera predecible.

Especificidad: Se refiere a la capacidad de un método o un test de screening para determinar sin equivocación un analito en presencia de otros componentes que en su conjunto se localizan dentro de la muestra a analizar.

Exactitud: Proximidad entre un valor medido y un valor verdadero del mensurando.

Falso negativo: Resultado negativo cuando el método de referencia da un resultado positivo.

Falso positivo: Resultado positivo cuando el método de referencia da un resultado negativo.

Incertidumbre: Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos al mensurando, a partir de la información que se utiliza.

Incertidumbre instrumental: Componente de la Incertidumbre de medida que procede del instrumento o sistema de medida utilizado.

Interferencia: Es aquella especie química que provoca un error sistemático en la determinación de un analito.

Intervalo: Amplitud entre la concentración mayor y menor donde se puede identificar un mensurando con un nivel adecuado de Precisión, Exactitud y Linealidad mediante el método empleado y donde se aplicara el mismo.

Instrumento de medida: Dispositivo utilizado para realizar mediciones, solo o asociado a uno o varios dispositivos suplementarios.

Límite de Cuantificación (LoQ): Se refiere a la mínima concentración del mensurando presente en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con un nivel de Precisión, Exactitud e Incertidumbre aceptable.

Límite de Detección: Valor medido, obtenido mediante un procedimiento de medida dado, con una probabilidad β de declarar erróneamente la ausencia de un constituyente en un material, dada una probabilidad α de declarar erróneamente su presencia.

Linealidad: Capacidad de un método analítico para obtener resultados proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática a la concentración del mensurando del parámetro de la muestra dentro de un Intervalo dado, es decir, es el Intervalo de concentraciones del mensurando dentro del cual los resultados obtenidos por el método son proporcionales a la concentración del analito.

Magnitud: Propiedad o fenómeno, cuerpo o sustancia, que puede expresarse cuantitativamente mediante un número y una referencia.

Magnitud de entrada: Magnitud que debe ser medida, o magnitud cuyo valor puede obtenerse de otra manera, para calcular un valor medido de un mensurando.

Magnitud de influencia: Magnitud que, en una medición directa, no afecta a la magnitud que realmente se está midiendo, pero sí afecta a la relación entre la indicación y el resultado de medida.

Magnitud de salida: Magnitud cuyo valor medido se calcula mediante los valores de las magnitudes de entrada en un modelo de medición.

Matriz: Conjunto de elementos del mismo tipo que comparten un elemento común.

Materiales de referencia (MR): Material o sustancia en donde el valor de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos para ser utilizados en la calibración de aparatos o en la evaluación de métodos de medición, también llamados patrones de medición, pero sus valores carecen de una declaración de Incertidumbre donde su trazabilidad es cuestionable y sus pruebas de significación se basan en la fidelidad observable de sus resultados.

Material de referencia certificado (MRC): Son materiales de referencia acompañados de un certificado, en el cual uno o más de los valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento o técnica de Validación que establece su trazabilidad y cada valor se acompaña de su Incertidumbre conocida con un nivel declarado de confianza que están sujetos a normas internacionales y pueden emplearse para estudiar simultáneamente todos los aspectos de sesgo.

Medición: Proceso que consiste en obtener experimentalmente uno o varios valores que pueden atribuirse razonablemente a una magnitud.

Mensurando: Magnitud que se desea medir. En química, la sustancia a analizar, el analito o el nombre de la sustancia o compuesto, se emplean algunas veces en lugar de mensurando. Esta práctica es errónea debido a que estos términos no se refieren a magnitudes.

Método de medición: Descripción genérica de la secuencia lógica de operaciones utilizadas en una medición. Pueden clasificarse en varias maneras como: método de sustitución, método diferencial, método de cero o método directo, método indirecto.

Método desarrollado por el laboratorio: Es un método analítico que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos, ni en publicaciones de terceros, habiendo sido desarrollados por el propio laboratorio.

Método no normalizado: Es un método analítico desarrollado por un tercero que ha sido adaptado por el laboratorio a partir de un método normalizado.

Método normalizado: Es un método analítico desarrollado o publicado por un organismo de normalización sea internacional, regional o nacional u otro organismo reconocido cuyos métodos son generalmente aceptados por sectores técnicos y que están publicados en normas oficiales.

Muestra blanco o testigo: Es una muestra que no va a someterse al tratamiento, y contra la que se va a comparar los resultados de las demás muestras tratadas.

Nivel de confianza: Es la probabilidad que el valor del mensurando permanezca dentro de la amplitud del rango de Incertidumbre.

Parámetros de desempeño de un método analítico: Son características cuantificables de un método que indican el grado de calidad del método, que necesitan ser evaluadas y que corresponden a: Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Incertidumbre, selectividad, especificidad, Sensibilidad, Robustez, Precisión, Linealidad e Intervalo de medición, Veracidad y otras características relacionadas con los resultados obtenidos.

Precisión: Proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas.

Precisión intermedia: Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de Precisión intermedia.

Procedimiento analítico: Es la manera en que se realiza un análisis. Este describe con detalle los pasos necesarios para realizar una prueba analítica. Puede tener los siguientes conocimientos: características de la muestra, preparación de los estándares de referencia y reactivos, uso de aparatos o instrumentos, generación de la curva de calibración, uso de formulas para cálculos.

Procedimiento de medición: Descripción detallada de una medición con forma uno o más principios de medida y a un método de medida dado, basado en un modelo de medida y que incluye los cálculos necesarios para obtener un resultado de medida.

Rango: Es el Intervalo de concentraciones del mensurando dentro del cual este método ofrece resultados proporcionales a su concentración y puede considerarse validado.

Repetibilidad: Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad.

Reproducibilidad: Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad.

Resultado de medición : Conjunto de valores de una magnitud atribuidos a un mensurando acompañados de cualquier otra información relevante disponible.

Robustez: Es un estudio realizado para medir o evaluar la capacidad o resistencia de los resultados de un método de permanecer inalterados por pequeñas variaciones intencionadas (o condiciones como las ambientales y/o de operación) en los parámetros del mismo método y nos permite obtener información acerca de su confiabilidad durante su uso normal.

Selectividad: Se refiere a la habilidad o capacidad de un procedimiento analítico para determinar exactamente y específicamente el mensurando de interés en presencia de varias interferencias en una matriz de muestra, de acuerdo al procedimiento dado y es aplicable a métodos en los que dos o más componentes son separados y cuantificados en una matriz completa.

Sensibilidad: Es la capacidad o habilidad de un método de detectar cambios en la respuesta de un instrumento de medición, dividido por el correspondiente cambio del estímulo o señal de entrada aludiendo a la pendiente de calibración.

Sesgo: Valor estimado de un error sistemático.

Trazabilidad: Propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la Incertidumbre de medida.

Validación: Verificación de que los requisitos especificados son adecuados para el uso previsto.

Valor de referencia: Valor de una magnitud que sirve como base de comparación con valores de magnitudes de la misma naturaleza.

Valor verdadero de una medición: Valor de una magnitud comparable con la definición de la magnitud.

Veracidad: Proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia. No es una magnitud y esta inversamente relacionada con el error sistemático.

Verificación: Aportación de evidencia objetiva de que un elemento satisface los requisitos especificados.

ANEXOS

A1 CARTAS CONTROL

Las cartas de control son la herramienta más poderosa para analizar la variación en la mayoría de los procesos. Han sido difundidas exitosamente en varios países dentro de una amplia variedad de situaciones para el control del proceso.

Las cartas de control enfocan la atención hacia las causas especiales de variación cuando estas aparecen y reflejan la magnitud de la variación debida a las causas comunes.

Las *causas comunes o aleatorias* se deben a la variación natural del proceso.

Las *causas especiales o atribuibles* son por ejemplo: un mal ajuste de máquina, errores del operador, defectos en materias primas.

Se dice que un proceso está bajo *Control Estadístico* cuando presenta causas comunes únicamente. Cuando ocurre esto tenemos un proceso estable y predecible. Cuando existen causas especiales el proceso está fuera de Control Estadístico; las gráficas de control detectan la existencia de estas causas en el momento en que se dan, lo cual permite que podamos tomar acciones al momento [74-75].

VENTAJAS:

- Es una herramienta simple y efectiva para lograr un control estadístico.
- El operario puede manejar las cartas en su propia área de trabajo, por lo cual puede dar información confiable a la gente cercana a la operación en el momento en que se deben de tomar ciertas acciones.
- Cuando un proceso está en control estadístico puede predecirse su desempeño respecto a las especificaciones. Los usuarios pueden contar con niveles consistentes de calidad y pueden contar con costos estables para lograr ese nivel de calidad.
- Una vez que un proceso se encuentra en control estadístico, su comportamiento puede ser mejorado posteriormente reduciendo la variación.
- Al distinguir entre las causas especiales y las causas comunes de variación, dan una buena indicación de cuándo un problema debe ser corregido localmente y cuando se requiere de una acción en la que deben de participar varios departamentos o niveles de la organización [74-76].

A2 PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV (KS)**CALIBRADOR 0 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra**

		ANF	COC	OPI	THC
N		10	10	10	10
Parámetros normales(a,b)	Media	.32850	.26020	.21110	.29030
	Desviación típica	.005701	.003048	.008825	.003860
Diferencias más extremas	Absoluta	.204	.196	.337	.132
	Positiva	.170	.196	.337	.132
	Negativa	-.204	-.142	-.211	-.096
Z de Kolmogorov-Smirnov	.644	.621	1.067	.417	
Sig. asintót. (bilateral)		.801	.835	.205	.995

a La distribución de contraste es la Normal.

b Se han calculado a partir de los datos.

CALIBRADOR 3 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		ANF	COC	OPI	THC
N		10	10	10	10
Parámetros normales(a,b)	Media	.47640	.34140	.34080	.34530
	Desviación típica	.014277	.005582	.014958	.005774
Diferencias más extremas	Absoluta	.189	.343	.274	.221
	Positiva	.129	.205	.274	.221
	Negativa	-.189	-.343	-.201	-.177
Z de Kolmogorov-Smirnov	.597	1.084	.867	.698	
Sig. asintót. (bilateral)		.868	.191	.440	.715

a La distribución de contraste es la Normal.

b Se han calculado a partir de los datos.

CALIBRADOR 5 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		ANF	COC	OPI	THC
N		10	10	10	10
Parámetros normales(a,b)	Media	.53340	.40300	.38610	.47700
	Desviación típica	.008527	.010614	.012914	.006307
Diferencias más extremas	Absoluta	.205	.338	.182	.224
	Positiva	.130	.198	.182	.134
	Negativa	-.205	-.338	-.128	-.224
Z de Kolmogorov-Smirnov	.649	1.067	.574	.710	
Sig. asintót. (bilateral)					

a La distribución de contraste es la Normal.

b Se han calculado a partir de los datos.

Cuando la distribución es mayor de 0,05 el % de significancia es de 5%, entra en la distribución normal. Cuando es menor o igual a 0,05 esto no se toma como distribución normal.

Por lo tanto para todos los calibradores se dan distribuciones normales esto se resaltaron en color gris para apreciarlos de una mejor manera.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Olaya, G.R., *Eficacia del programade reforzamiento comunitario mas incentivo para el tratamiento de la adiccion a la cocaina*, in *Departamento de Psicologia*. 2008, Universidad de Oviedo: Oviedo,España p. 225 [citado 23 de Ma rzo del 2011].
2. Fernando, C.M., *las drogas educacion y prevencion*. 2004 ed. Vol. 1. 2004, Madrid. 224 [citado 23 de Marzo del 2011].
3. CONSUMO, M.D.S.Y., S.G.d.Sani dad, and D.d.G.p.e.P.N.s. *Drogas. Guía sobre drogas*. [electronico] 2007 [citado 31 de Marzo del 2011]; MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO Secretaría General de Sanidad Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas: Obtenido de: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/publica/pdf/guiaDrogas.pdf>.
4. Sul, U.B.e.C. and E.d.N.U.c.D.e. *Crime. drogas*. [electronico] [citado 31 de Marzo del 2011]; UNODC Viena United Nations Office on Drugs and Crim e: Obtenido de: http://www.unodc.org/pdf/brazil/drogas_ebook.pdf.
5. Guardado Pérez, M.T. *Métodos analíticos adecuados a su propósito*. [Electronico] 2005 [citado 03 de febrero del 2011]; segunda edición:[Guía para la Validación de métodos y tem as relacionados]. Obtenido de: <http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/descarga/default.aspx?arch=/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf>.
6. Abuse), N.N.I.o.D. *el abuso de las drogas y la drogadiccion*. [electronico] 2008 [citado 23 de Marz o del 2011] ; National Institute of Healt:[Obtenido de: <http://drugabuse.gov/PDF/InfoFacts/Understanding-Sp08.pdf>
7. Drogadicción, F.d.A.c.l. (2008) *¿Qué es una droga?* 1, 12 DOI: M-2060-97.
8. Salud, O.M.d.l., *Lexicon of Alcohol and Drug Terms*, in *Lexicon of Alcohol and Drug Terms*, O.M.d.l. Salud, Editor.[electronico] 1994: Madrid. p. 66 [citado 23 de Marzo del 2011].
9. Alfred, G.G., *Las bases farmacologicas de la terapeutica* 10a ed. Vol. 1. 2003, Mexico. pag. 2049 [citado 23 de Marzo del 2011].
10. Roberto, T.C. [electronico] (2004) *El consumo de las drogas en Mexico: diagnostico, tendencias y acciones* 7 [citado 23 de Marzo del 2011] .
11. FUENTE, Y.R.D.L. *Wittgenstein: la filosofía como phármakon del encantamiento del lenguaje*. [electronico] 2002 [citado 23 de marzo del 2011]; Obtenido de: <http://revistas.ucm.es/fsl/15756866/articulos/ASEM0202110297A.PDF>.
12. Dario, C.P., *Toxicologia*. 5a ed. Vol. 1. 2006, Bogota, Colombia. 1022.
13. CONASET, G.d.C.C.Y. *Alcohol, Drogas Ilegales y Farmacos*. [electronico] [citado 31 de Marzo del 2 011]; Gobierno de Chile:[Obtenido de: http://www.conaset.cl/images/doc/clase2_tipos_de_drogas_modif.pdf.
14. Doblezer, E. *Breve historia de la marihuana*. 2001 [citado 03 de Marzo del 2011]; Obtenido de: <http://www.enriquedoblezer.e.telefonica.net/historia/Brevehistoria.pdf>
15. M.a Luisa Gil del Castillo, J.A.N.V. and P.M. Hernández [electronico] (2005) *THC droga o medicamento.Determinación analítica*. 9 [citado 31 de Mar zo del 2011] .
16. psicofarmacos, *cannabis*. [electronico] 2009 [citado 31 de Marzo del 2011].
17. Hays, J. *MARIJUANA AND HASHISH—CANNABIS PLANT, TYPES AND HISTORY*. [FOTO] 2009 [citado 31 de Marzo del 2011]; Obtenido de: <http://factsanddetails.com/world.php?itemid=1222&catid=54&subcatid=348>.

18. BALCELLS OLIVERÓ, M. *Toxicología del cannabis*. [artículo electrónico] 2006 [citado 13 de Diciembre del 2010]; 6]. Obtenido de: <http://www.adicciones.es/files/bacells%20169-174.pdf>.
19. Jaramillo, M. *Medicina y adicciones*. [electrónico] 2007 [citado 31 de Marzo del 2011]; Obtenido de: <http://medicinayadicciones.blogspot.com/2007/11/sesion-vi.html>.
20. especiales, R.A. *Interpretación de las pruebas para el screening de drogas de abuso*. [electrónico] [citado 05 de Abril del 2011]; Obtenido de: <http://www.reialab.com/es/clientes/drogas.htm>.
21. Massof, R.W., *Understanding rasch and item response theory models: applications to the estimation and validation of interval latent trait measures de responses to rating scale questionnaires*. *Ophthalmic Epidemiol.* 18(1): p. 1-19.
22. Hernandez, C.R. (2008) *toxicos en orina*. 1, 61.
23. Pascual Simón JR, F.R.B. (2002) *Consideraciones generales sobre drogas de abuso*. 1, 14.
24. Pascual Simón JR, F.R.B.A.S.D.I., et al., *CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE DROGAS DE ABUSO*. MEDISAN, 2002. 6: p. 14.
25. Danny, B. *Uso de la Cocaína con fines investigativos*. [electrónico] 2010 [citado 31 de Marzo del 2011]; Obtenido de: <http://cosasdequimicos.blogspot.com/2010/01/uso-de-la-cocaina-con-fines.html>.
26. *Modificació enzim "CocE": Tractament per a la intoxicació per cocaïna....* [electrónico] 2010 [citado 31 de Marzo del 2011]; Obtenido de: <http://inc87.wordpress.com/category/ciencia/>.
27. UTRILLA, P. (2000) *Aspectos farmacológicos de las anfetaminas*. 1, 11.
28. Fuertes, D. *Éxtasis para superar el estrés postraumático*. [electrónico] 2010 [citado 1 de Abril del 2011]; Obtenido de: <http://www.larazon.es/noticia/4866-extasis-para-superar-el-estres-postraumatico>.
29. Shariff, M.I., et al., *Urinary Metabolic Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma in an Egyptian Population - A Validation Study*. *J Proteome Res.*
30. *drogas: mas informacion menos riesgos* [electrónico] 2008 [citado 01 de Abril del 2011]; Obtenido de: <http://amuvasalud.blogspot.com/2008/09/drogas-ms-informacin-menos-riesgos.html>.
31. sanitarios, a.e.d.m.y.p. *anfetamina*. [electrónico] [citado 01 de Abril del 2011]; Obtenido de: <http://www.psicofarmacos.info/?contenido=varios&farma=anfetaminahttp>.
32. Iribarren, M.M., et al., *Validation and Psychometric Properties of the State Impulsivity Scale (SIS)*. *Actas Esp Psiquiatr.* 39(1): p. 49-60.
33. los, D.d.S.y.S.H.d. and E.U.I.N.d.I. Salud. *La Heroína*. [electrónico] 2010 [citado 05 de Abril del 2011]; Obtenido de: <http://drugabuse.gov/PDF/Infofacts/Heroina10.pdf>Departamento.
34. drogas, p.n.s. *guia sobre drogas*. [electrónico] 2007 [citado 01 de Abril del 2011]; Obtenido de: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/publica/publicaciones/Guia2008/heroina.htm>.
35. *descriptiva de algunas drogas*. [electrónico] 2010 [citado 01 de Abril del 2011]; Obtenido de: <http://todoesquimica.blogia.com/temas/descriptiva-de-algunas-drogas.php>.
36. Foulkes, A.S., et al., *Prediction based classification for longitudinal biomarkers*. *Ann Appl Stat.* 4(3): p. 1476-1497.
37. Gennaro, A.R.D., *Remington Farmacia*, M. Panamericana, Editor. 2003.

38. Diagnóstico, A.D. *Introducción a los Inmunoensayos*. [Electronico] 2008 [citado 12 de Enero del 2011]; Obtenido de: http://latinoamerica.abbottdiagnostics.com/ciencia/pdf/1_d.pdf
39. Nora, F. *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*. [Electronico] 2007 [citado 26 de Enero del 2011]; Obtenido de : <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/elisa.pdf>
40. Cultek. *Fundamentos y Tipos de ELISAs*. [Electronico] 2008 [citado 26 de Enero del 2011]; Obtenido de: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>
41. BEHRING, D. *Emít II Plus Drogas de abuso Assay*. [inserto] 2008 [citado 10 de Abril del 2011]; Siemens Healthcare Diagnostics Inc:[Obtenido de: www.siemens.com/diagnostics.
42. Oviedo, U.d. *Espectrofotometría de absorción visible-UV: Complejos de cobre y* [Electronico] 2007 [citado 05 de Febrero del 2011]; Obtenido de: [http://156.35.33.98/QFAnalitica/trans/ExpquimDimas/PRACT_17_Espectrofotometria vis UV.pdf](http://156.35.33.98/QFAnalitica/trans/ExpquimDimas/PRACT_17_Espectrofotometria_vis_UV.pdf).
43. Lanevskij, K., et al., *QSAR analysis of blood-brain distribution: The influence of plasma and brain tissue binding*. J Pharm Sci.
44. Roberto, G. *Introducción a la fotometría*. [Electronico] 2006 [citado 05 de Febrero del 2011]; Obtenido de: <http://www.scribd.com/doc/18936014/introduccion-a-la-fotometria>.
45. químicas, F.d.c. *Análisis cuantitativo de la absorción de radiación electromagnética*. [Electronico] [citado 05 de Febrero del 2011]; Obtenido de: <http://www.fcq.uach.mx>.
46. Armeanu-Ebinger, S., et al., *Differential expression of invasion promoting genes in childhood rhabdomyosarcoma*. Int J Oncol.
47. americano, R.t.c. *Productos farmacéuticos Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos*. [electronico] 2006 [citado 25 de Marzo del 2011]; MINECO, CONACYT, MIFIC, SIC, MEIC: Obtenido de: <http://www.comex.go.cr/acuerdos/centroamerica/Resoluciones/ANEXO%20RTCA%20188.pdf>.
48. Roció, C.C.E. *Validación de métodos de medición*. [electronico] [citado 25 de Febrero del 2011]; EMA, cumpliendo la misión de servir a México y a nuestros clientes: Obtenido de: <http://www.udlap.mx/Conoce/video/files/02ValidaciondeMetodosdeMedici%C3%B3n.pdf>.
49. Federico, C. *Recomendaciones armonizadas para la Validación de métodos de análisis en un solo laboratorio*. [electronico] 2005 [citado 23 de Febrero del 2011]; Resolución OENO 8/2005, OIV, Paris, 20 de julio de 2005, In forme técnico: Obtenido de: http://news.reseau-concept.net/images/oiv_es/Client/Resolution_OENO_ES_2005_08.pdf.
50. C.A, O.d.a.G. *Política de selección y Validación de métodos de ensayo*. [electronico] 2007 [citado 23 de Febrero del 2011]; OGA-GEC-016, Guatemala, 29 de enero de 2007: Obtenido de: <http://www.oga.org.gt/images/files/File/OGA-GEC-016.pdf>.
51. García Eva Rosas, C.C.R. *Validación con base en los criterios de aplicación de la norma NMX-EC-17025-IMNC.2006 en mediciones químicas y físicas*. [electronico] 2006 [citado 12 de Diciembre del 2010]; Obtenido de: http://www.ema.org.mx/descargas/ema_semec09/11_junio/12aplicacion17025_11junio.pdf.
52. Soso Ariel, R.A., Marbán Liliana, Fiorani Viviana. *Validación de métodos analíticos*. [electronico] 2008 [citado 15 de Diciembre del 2010]; AACs, BCR,

IRAM: Obtenido de:

http://www.suelos.org.ar/adjuntos/validacion_metodos_analiticos.pdf.

53. Moreno, A. *Propuesta de documentación de Validación de métodos para cumplir con la norma ISO/IEC 17025:1999*. [electronico] 2005 [citado 14 de Diciembre del 2010]; CENAM , Laboratorio de impedancia:[Obtenido de: <http://www.cenam.mx/dme/pdf/EXT-Propuesta%20de%20Documentaci%C3%B3n%20de%20Validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos.pdf>].
54. Alvarez, P. *Requerimientos sobre Validación de métodos en el marco de la acreditación de laboratorios según la norma ISO 17025*. [electronico] [citado 11 de Diciembre del 2010]; Instituto nacional de tecnología industrial (INTI), ministerio de producción, secretaria de industria, comercio y de la pequeña y mediana empresa.: Obtenido de: <http://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/seminario/apuntes.pdf>.
55. Acreditación, O.A.d. *Guía para Validación de métodos de ensayo*. [electronico] 2003 [citado 22 de Enero del 2011]; OAA, Versión 1, Código: DC-LE-05:[Obtenido de: <http://www.oaa.org.ar/evaluadores/DC-LE-05.pdf>].
56. Barlandas Rendón, Q.P ., Lara Rodríguez, Gudiño Ramírez, Rosas García, Balderas Escamilla, Mitani Nakanishi, Pérez Urquiza. *Guía para la Validación y Verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico*. [electronico] 2008 [citado 24 de Marzo del 2011]; CENAM, EMA:Obtenido de: http://www.ema.org.mx/descargas/guias_tecnicas/ensayos_clinicos/laboratorios_clinicosv00.pdf.
57. GMIGLIARINO. *Validación de métodos cualitativos caso de aplicación*. [electronico] 2007 [citado 15 de Marzo del 2011]; Consultores.: [Obtenido de: <http://acnet.com/portals/75/PDFs/validacion%20de%20metodos%20cualitativos.pdf>].
58. Guerrero, H.P. *Verificación y Validación de métodos*. [electronico] 2008 [citado 23 de Marzo del 2011]; Dirección técnica de acreditación, Instituto boliviano de metrología, DTA-CRI-016, : [Obtenido de: <http://www.ibmetro.gob.bo/pdf/acreditacion/DTA-CRI016%20V1%20VERIFICACION%20Y%20VALIDACION%20DE%20METODOS.pdf>].
59. German, R. *Validación de métodos de análisis*. [electronico] [citado 18 de Marzo del 2011]; Staub Químico: [Obtenido de: <http://www.scribd.com/doc/18950740/Validacion-de-metodos-German-Roberto-Staub>].
60. Rao, S.A., et al., *More than meets the eye: Digital fraud in dentistry*. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 28(4): p. 241-4.
61. Alicia, M.S., *Incertidumbre en Métodos Analíticos de Rutina*, in *Departamento de química analítica y química orgánica* 2002, Universidad Rovira y Virgili: Tarragona. p. 304.
62. Moré Chang Carmen Xiomara, G.M.M.B. *Incertidumbre de las mediciones en el laboratorio clínico*. [electronico] 2007 [citado 06 de Abril del 2011]; Obtenido de: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/uvs/patologiaclinica/Incertidumbre.pdf>.
63. Gonzáles Hernández Rolando, L.G.J., Gonzáles Lavaut José Antonio, Sordo Martínez Lissette, Rivera Grau Jacqueline. *Validación retrospectiva de las Técnicas espectrofotométricas para la determinación de las prostaglandinas A2 y B2 en extractos de Plexaura homomalla*. [electronico] 2001 [citado 23 de Marzo del 2011]; Obtenido de:

- http://www.latamjpharm.org/trabajos/20/1/LAJOP_20_1_1_5_XNP37UWC1E.pdf.
64. Gonzalez, M.A., et al., *Reliability using the universal classification of acute myocardial infarction compared to ST-segment classification*. Cardiovasc Revasc Med.
 65. Ricard, B. “*La selectividad en análisis químico*.”. [electronico] [citado 23 de marzo del 2011]; Obtenido de: <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/selectividad.pdf>.
 66. Gillian Chaloner-Larsson, R.A., Anik Egan. *Guía de la OMS sobre los requisitos de las practicas adecuadas de fabricación (PAF)*. [electronico] 1998 [cita do 25 de Marzo del 2011]; Segunda parte: Validación, Programa mundial de vacunas e inmunización, Suministro y Calidad de las vacunas, Red mundial de capacitación, Organización mundial de la salud Ginebra [Obtenido de: <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF/www9811.pdf>.
 67. sanitarios, A.e.d.m.y.p. *Anexo 15 Cualificación y Validación*. [electronico] [citado 25 de Marzo del 2011]; Ministerio de Sanidad y Consumo: [Obtenido de: <http://www.aemps.es/actividad/sgInspeccion/docs/28-anexo15.pdf>.
 68. Rebeca, R. *Validación de procesos*. [electronico] [citado 25 de Marzo del 2011]; Experto Nacional en Medicamentos, FDA. Disponible: [Obtenido de: <http://www.paho.org/Spanish/AD/THS/EV/bpm-validacion-procesos-fda.ppt#42>.
 69. Estado, G.d., *Reglamento de Transito y Vialidad del Estado de Michoacan de Ocampo*, T.d. Estado, Editor. 2008: Michoacan. p. 143.
 70. *ISO/IEC 17025-2005 NMX-EC-17025-IMNC-2006, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibracion*. 2005.
 71. *ISO 15189-2007 NMX-EC-15189-IMNC-2008, Laboratorios clinicos- Requisitos particulares para la calidad y la competencia*. 2007.
 72. *ISO 5725-1,4-1994 MNX 5725-4 IMNC-2006 Exactitud(veracidad y precision) de resultados y metodos de medicion parte 4 metodo basico para la determinacion de la veracidad de un metodo de medicion normalizado* N. ISO, Editor. 2006.
 73. *vocabulario internacional de metrologia (vim)*. [electronico] 2008 [citado 13 de Marzo del 2011]; Obtenido de: http://www.sim-metrologia.org.br/docs/span_VIM.pdf.
 74. H. Hernandez *Cartas de control* [Electronico] 2005 [citado 20 de Marzo del 2011] Obtenido de: [www.icicm.com/files/Cartas de Control.doc](http://www.icicm.com/files/Cartas_de_Control.doc).
 75. Silvio Andrés M, J.J.N, J.F.C. *Uso de cartas control para el analisis de calidad en manufactura de sacos de polipropileno* [electronico] 2006 [citado 20 de Marzo del 2011] Universidad de Cauca. Obtenido de: <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol4/8.pdf>
 76. Francisco Eljach, G .P, R.P.P.N. *Evaluación del uso de las cartas control X, EWMA y CUSUM en un sistema de control de calidad para procesos no correlacionados* [electrónico] 2006 [citado 20 de Marzo del 2011] Universidad del Norte Barranquilla, Colombia. Obtenido de: http://ciruelo.uninorte.edu.co/pdf/ingenieria_desarrollo/20/evaluacion_del_uso.pdf