

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**

**NUEVOS TIEMPOS, NUEVAS IDEAS**



**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**“VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA POR CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS DE ALPRAZOLAM, DIAZEPAM Y CLONAZEPAM EN MUESTRAS DE ORINA EN PACIENTES ADULTOS DEL HOSPITAL DOS DE MAYO EN EL AÑO 2017”.**

Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico

**TESISTAS:**

**Bach:** APAZA CONDORI JENNY ELIZABETH

**Bach:** VELASQUEZ ROZAS ANA LIDIA

**ASESOR:** Mg. CARLOS M. CASANA VARGAS

**FECHA DE SUSTENTACIÓN:** 07 de marzo 2018

**LIMA-PERÚ**

**2018**

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
INDICE DE ANEXOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>3</b>
1.1 Descripción de la Realidad Problemática .....	3
1.2 Formulación del problema .....	4
1.3 Problema general .....	5
1.4 Problemas específicos .....	5
1.5 Objetivos de la investigación .....	5
1.5.1 Objetivo general .....	5
1.5.2 Objetivos específicos .....	6
1.6 Justificación e importancia del estudio .....	6
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>8</b>
2.1 Antecedentes .....	8
2.1.1 Antecedentes nacionales .....	8
2.1.2 Antecedentes internacionales .....	9
2.2 Bases Teóricas .....	11
2.2.1 Benzodiacepinas .....	11
2.2.2 Farmacología .....	11
2.2.3 Farmacocinética .....	12
2.2.4 Mecanismo de acción .....	12
2.2.5 Clasificación .....	14
2.2.6 Usos terapéuticos .....	15

2.2.7 Efectos adversos .....	15
2.2.8 Diazepam.....	16
2.2.9 Clonazepam.....	17
2.2.10 Alprazolam .....	18
2.2.11 Rutas Metabólicas de Benzodiazepinas. ....	18
2.2.12 Validación .....	20
2.2.13 Cromatografía en capa fina.....	24
2.2.14 Toma de muestra.....	26
2.2.15 Recolección de muestras.....	28
2.2.16 Análisis toxicológico orgánico .....	30
2.3 Formulación de la Hipótesis .....	30
2.3.1 Hipótesis general .....	30
2.3.2 Hipótesis específicas .....	30
2.4 Variables .....	31
2.4.1 Operacionalización de variables .....	31
2.5 Marco Conceptual .....	32
<b>CAPÍTULO III: MÉTODO .....</b>	<b>34</b>
3.1 Tipo de estudio.....	34
3.2 Diseño a utilizar.....	34
3.3 La población y muestra .....	34
3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	35
3.5 Procesamiento de datos.....	38
<b>CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
4.1 Presentación de resultados.....	39
4.2 Contrastación de hipótesis .....	45
4.3 Discusión de resultados .....	52
<b>CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>56</b>

5.1 CONCLUSIONES.....	56
5.2 RECOMENDACIONES .....	56
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>57</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos de diazepam, clonazepam y alprazolam .....	20
Tabla 2. Operacionalización de variables:.....	32
Tabla 3. Distribución de muestras de orina con previa medicación de benzodiazepinas. ....	35
Tabla 4. Identificación general de benzodiazepinas, evaluadores 1, 2 y 3 seguido de los Rf.....	40
Tabla 5. Identificación de alprazolam, evaluador 1, 2,3 y su Rf .....	41
Tabla 6. Identificación de diazepam, evaluador 1, 2, 3 y su Rf .....	42
Tabla 7. Identificación de clonazepam, evaluador 1, 2, 3 y su Rf.....	43
Tabla 8. Fases móviles empleadas para corrida cromatografía. ....	44
Tabla 9. Factores de retención de benzodiazepinas identificadas con su respectivo revelador .....	44
Tabla 10. Contingencia de la identificación de metabolitos de Alprazolam por 2 observadores.....	47
Tabla 11. Contingencia de la identificación de metabolitos de Diazepam por 2 observadores.....	49
Tabla 12. Contingencia de la identificación de metabolitos de Clonazepam por 2 observadores.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura Química de las Benzodiazepinas.....	11
Figura 2. Mecanismo de acción de las Benzodiazepinas.....	13
Figura 3. Determinación de Rf.....	26
Figura 4. Identificación de Benzodiazepinas .....	45
Figura 5. Distribución de las frecuencias de identificación de metabolitos de Alprazolam por los observadores 1 y 2 .....	48
Figura 6. Distribución de las frecuencias de identificación de metabolitos de Diazepam por los observadores 1 y 2 .....	50
Figura 7. Distribución de las frecuencias de identificación de metabolitos de Clonazepam por los observadores 1 y 2 .....	52

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia .....	63
Anexo 2. Fluxograma del análisis químico toxicológico –fase1 .....	64
Anexo 3. Fluxograma del análisis químico toxicológico –fase2.....	65
Anexo 4. Separación de fases orgánica y acuosa .....	66
Anexo 5. Proceso de filtración.....	66
Anexo 6. Tornasol para medir acidez o alcalinidad – pH - .....	67
Anexo 7. Preparación y activación de placas .....	67
Anexo 8. Extracto seco 1° fase .....	68
Anexo 9. Sembrado de muestras problemas (benzodicepinas) en placas cromatográficas .....	68
Anexo 10. Placas cromatográficas en fase móvil.....	69
Anexo 11. Reactivos reveladores empleados en identificación de benzodicepinas ...	69
Anexo 12. Ensayos de identificación de tipos de benzodicepinas (diazepam, clonazepam, alprazolam, clordicepóxido) .....	70
Anexo 13. Ensayos de identificación de benzodicepinas como grupo farmacológico .....	70
Anexo 14. Juicio de experto, validación N# 1 .....	71
Anexo 15. Juicio de experto, validación N#2 .....	72
Anexo 16. Juicio de expertos, validación N#3 .....	73
Anexo 17. Flujograma de actividades .....	74

## RESUMEN

Se planteó como objetivo validar una técnica analítica por cromatografía de capa fina para identificar metabolitos de alprazolam, diazepam, clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017. Metodología: la investigación fue de tipo observacional, descriptiva, cualitativo, al analizarse la causa y efecto que generarán las variables propuestas en el presente estudio. Diseño experimental, de tipo “cuasi experimental”. Donde se tendrá un grupo control y uno experimental. El número de muestras analizadas fue de 60 muestras de orina, de pacientes adultos voluntarios con medicación de benzodiazepinas en el Hospital Dos de Mayo. Se identificaron metabolitos de alprazolam, diazepam y clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo mediante el empleo de los reactivos reveladores Iodoplatinato, Dragendorff más ácido clorhídrico. Resultados: Los diferentes ensayos permitieron identificar a las benzodiazepinas mediante el empleo de fases móviles y reactivos reveladores. Conclusiones: Se logró validar una técnica analítica para identificar benzodiazepinas por el método de cromatografía en capa fina, la cual mostró una selectividad marcada evaluada por los expertos toxicólogos que permitieron contrastar nuestra hipótesis sobre validación de una técnica selectiva para identificación de benzodiazepinas.

**Palabras claves: Cromatografía en Capa Fina, benzodiazepinas, alprazolam, diazepam, clonazepam.**



## **ABSTRACT**

The objective was to validate an analytical technique by thin layer chromatography to identify metabolites of alprazolam, diazepam, clonazepam in samples of urine in adult patients of the Hospital Dos de Mayo in 2017. Methodology: the investigation was observational, descriptive type , qualitative, by analyzing the cause and effect generated by the variables proposed in this study. Experimental design, of "quasi-experimental" type. Where you will have a control group and an experimental group. The number of samples analyzed was 60 urine samples from adult volunteers with benzodiazepine medication at the Dos de Mayo Hospital. Metabolites of alprazolam, diazepam and clonazepam were identified in urine samples in adult patients of the Dos de Mayo Hospital through the use of the revealing reagents Iodoplatinate, Dragendorff plus hydrochloric acid. Results: The different assays allowed the identification of benzodiazepines through the use of mobile phases and revealing reagents. Conclusions: It was possible to validate an analytical technique to identify benzodiazepines by the thin layer chromatography method, which showed a marked selectivity evaluated by the expert toxicologists that allowed to contrast our hypothesis on validation of a selective technique for the identification of benzodiazepines.

**Key words: Thin Layer Chromatography, benzodiazepines, alprazolam, diazepam, clonazepam.**

## INTRODUCCIÓN

La cromatografía en capa fina (CCF) identifica sustancias químicas y metabolitos en diferentes fluidos biológicos y compuestos mediante la utilización de reactivos reveladores, el cual es mayor importancia ya que permite identificar la presencia de dichas sustancias y servir como apoyo en el campo clínico y forense principalmente que constituye parte de nuestro trabajo. Es importante la identificación de las benzodiazepinas en el campo forense porque esta sustancia está vinculada a hechos o delitos como hurto, secuestros, delitos contra la libertad sexual, entre otros.

Las benzodiazepinas tienen propiedades ansiolíticas, tranquilizantes, anticonvulsivantes y miorelajantes, y pueden presentar en un individuo somnolencia, letargia, estupor y coma dependiendo de la dosis y vía de administración empleada, pero que cuando es empleada de forma concomitante con otros depresores sobre todo con el alcohol etílico, puede llegar a un efecto de dopaje que llega incluso a la muerte de acuerdo a las concentraciones de ambas sustancias ingeridas.

En la óptica forense el uso de estas sustancias hace que la persona que se encuentre bajo los efectos de esta sustancia disminuya su conciencia, altere su percepción de la realidad, afecte su voluntad y facilite la acción de los agresores en su intento delictivo (hurto, delito contra la integridad sexual), los cuales serán identificados mediante diversas técnicas analíticas, una de ellas la cromatografía en capa fina, pero que es necesario la validación de parte de los expertos toxicólogos para verificar su identificación, selectividad y posterior validación, ello aportará a la justicia métodos validados, y serán las autoridades con los apoyos analíticos establecer un hecho de culpabilidad o inocencia de un individuo.

El desarrollo de técnicas analíticas de sensibilidad y selectividad para identificar benzodiazepinas necesita de técnicas continuas, renovadas y de equipos especializados para confirmar esta prueba, donde es fundamental tener patrones o estándar referentes de la sustancia investigada. La identificación de benzodiazepinas ha sido posible con las diferentes técnicas recogidas de revistas, manuales, guías, papers, búsqueda en las redes, tesis desarrolladas en pre y pos grado, los cuales fueron validados por los expertos. Es posible su identificación que servirá en el campo forense para su identificación en fluidos biológicos, sustancias propias y otros donde se pueda realizar el análisis referido al examen químico toxicológico.

# CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

## 1.1 Descripción de la Realidad Problemática

“Las benzodiazepinas son las drogas psicotrópicas más ampliamente utilizadas en todo el mundo debido a su gran eficacia, rápido inicio del efecto terapéutico y perfil de efectos secundarios generalmente favorable, son particularmente útiles en los pacientes que precisan un alivio sintomático inmediato.” (1).

Como consecuencia de su uso en diversas patologías relacionadas a la ansiedad, suele ocurrir un abuso de parte de los pacientes no solo en la duración del tratamiento sino también en la dosis utilizada, la misma que además de producir tolerancia conlleva a una dependencia. (2, 3)

Es de suma importancia entonces el uso de diferentes procedimientos que permitan identificar los metabolitos pertenecientes a este grupo de fármacos, de manera que se pueda tener un mayor control sobre los pacientes que los consumen, especialmente si tomamos en cuenta que existe un aumento en el riesgo de accidentes de las personas que lo consumen. (2, 4)

Las benzodiazepinas son fármacos depresores del sistema nervioso central con actividad ansiolítica, tranquilizante, miorrelajantes, anticonvulsivante y dependiendo de la dosis puede actuar como hipnótico, lo que hace que la DIGEMID lo haya incluido en la lista de los psicotrópicos por lo que sólo debe ser atendido bajo receta médica, ya que su uso inadecuado puede generar dependencia, o estar comprometido en hechos delictivos.

En el Perú la determinación de análisis químico toxicológicos (identificación de benzodiazepinas) pueden ser realizados por laboratorios de referencia, sin embargo, para los aspecto médico-legales y requeridos por la justicia (poder judicial) sólo tienen valor legal aquellos análisis realizados por los laboratorios forenses toxicológicos: Policía Nacional del Perú (PNP) y Ministerio Público (MP), quienes emiten dictámenes periciales a partir de un screening toxicológico como grupos farmacológico, no especificando el tipo de benzodiazepina y sus metabolitos, lo cual sería de mucha utilidad, ya que de esa forma se pueden aproximar los tiempos de vida media, determinar por procesos farmacocinéticas el tiempo de administración del fármaco y el tiempo de permanencia en el organismo, sobre todo cuando están ligados al efecto pepazo para producir un hurto o cometer un delito contra la libertad sexual.

Por otro lado, si bien es cierto existen laboratorios que pueden determinar de manera específica los tipos de metabolitos, deben cumplir una serie de normativas como certificación, acreditación, para acreditar resultados y tener una mayor confiabilidad, se debe mencionar que, para aspectos médicos legales, solo los resultados de la PNP y MP son válidos al momento de una audiencia judicial.

Pueden emplearse otras técnicas que muestren además reproducibilidad, repetibilidad, confiabilidad, que garantice el resultado, considerándose a la cromatografía de capa fina como tal, la cual representa un menor costo frente a otras técnicas.

## **1.2 Formulación del problema**

La identificación de benzodiazepinas se realiza por diferentes técnicas, siendo la cromatografía en capa fina un método analítico válido, que puede ser identificada en fluidos biológicos y que se pretende validar mediante

juicio de expertos, por lo que la formulación del problema conlleva a demostrar la validación de la técnica selectiva.

### **1.3 Problema general**

¿Se puede validar una técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de alprazolam, diazepam y clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017?

### **1.4 Problemas específicos**

¿De qué forma la validación de la técnica analítica por cromatografía en capa fina permite identificar metabolitos de alprazolam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017?

¿De qué forma la validación de la técnica analítica por cromatografía en capa fina permite identificar metabolitos de diazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017?

¿De qué forma la validación de la técnica analítica por cromatografía en capa fina permite identificar metabolitos de clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017?

### **1.5 Objetivos de la investigación**

#### **1.5.1 Objetivo general**

Validar una técnica analítica por cromatografía de capa fina para identificar metabolitos de alprazolam, diazepam, clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

Validar la técnica analítica por cromatografía de capa fina para identificar metabolitos de alprazolam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017.

Validar la técnica analítica por cromatografía de capa fina para identificar metabolitos de diazepam, en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017.

Validar la técnica analítica por cromatografía de capa fina para identificar metabolitos de clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017.

### **1.6 Justificación e importancia del estudio**

En el Perú la detección de benzodiazepinas se realiza mediante diferentes técnicas y métodos analíticos, sin embargo no se tiene conocimiento que una técnica determinada por cromatografía en capa fina para identificación de benzodiazepinas se encuentre validada; por lo que nuestro trabajo de investigación pretende validar una técnica que permita obtener resultados confiables, fidedignos, para su posterior uso y aplicación en diversos laboratorios ya que es de bajo costo y sencillo en comparación de otros métodos y técnicas, donde es importante evaluar los límites de detección y sensibilidad, repetibilidad, reproducibilidad y robustez que tenga cada método.

Ello va a contribuir de manera directa en la identificación de estas sustancias sobre todo en casos de dopaje, hurto, delitos contra la libertad sexual, entre otros, que estén relacionados directa o indirectamente con delitos y se pueda contribuir de manera eficiente a las autoridades de justicia, donde la sentencia sea clara, objetiva e imparcial.

Desarrollar este trabajo de investigación facilitará a los toxicólogos un panorama mayor sobre métodos, ensayos preliminares y de confirmación a fin de perfeccionar los resultados analíticos y que estos sean seguros, confiables, objetivos, con un alto índice de calidad.



## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Antecedentes**

#### **2.1.1 Antecedentes nacionales**

Román Marquina, Trujillo (2015) realizó la tesis "Identificación de benzodiazepinas en situaciones delictivas investigadas por la dirección territorial de policía (DIRTEPOL) La Libertad, enero 2012 – diciembre 2013", cuyo objetivo fue la identificación de benzodiazepinas en muestras obtenidas en situaciones delictivas. Un total de 161 muestras procedentes de los años 2012 y 2013, fueron sometidos a cromatografía en capa fina. Los resultados obtenidos para benzodiazepinas positivo fueron 43,84% y 44, 32% para el 2012 y 2013 respectivamente. Además, en el año 2012 se encontraron los siguientes valores, 9,59% para Alprazolam; 15,07% para Diazepam; 12,33% para Bromazepam y 6,85% para Clonazepam. En el año 2013 las cifras encontradas fueron, 3,41% para Alprazolam; 20,46% para Diazepam; 13,64% para Bromazepam y 6,81% para Clonazepam. Mientras que el mayor porcentaje del tipo de muestra en el periodo 2012-2013 fue el recipiente con 46.57% y 47.73 respectivamente. (5)

Retuerto M, Lima (2015), realizó un trabajo de tesis con el objetivo de determinar la presencia de cocaína, marihuana, anfetaminas, barbitúricos y benzodiazepinas en muestras de orina de 1339 escolares cuyas edades fluctúan entre los 14 y los 20 años. El estudio se llevó a cabo durante los meses de agosto-diciembre de 1999 en escolares del 4to y 5to año de Secundaria. Metodología fue

observacional, retrospectiva, analítica. Resultados y conclusiones: de las muestras analizadas el 28.16% resultaron positivos para cocaína, el 22.93% positivos para marihuana y el 51.1% no corresponde a ninguna sustancia. (6)

### **2.1.2 Antecedentes internacionales.**

Valenzuela Morales, México (2013) en su tesis de grado, "Propuesta de una metodología para detección de drogas de abuso en muestras de orina, en el laboratorio de análisis clínicos del centro de investigación en ciencias médicas" se trazó como objetivo proponer una metodología eficiente y confiable para la detección de drogas de abuso en muestras de orina en el laboratorio de Análisis Clínicos del Centro de Investigación en Ciencias Médicas. El método que empleó fue el de una correcta realización de técnicas y procedimientos que involucran desde la toma de muestras hasta la obtención del resultado. Conclusiones: la metodología de inmunoquimioluminiscencia es eficiente y sencillo para la identificación de drogas de abuso en muestras de orina en el laboratorio de análisis clínicos del Centro de Investigación en Ciencias Médicas. (7)

Fonseca Tapia G, Ecuador (2016) en su tesis doctoral Determinación de benzodiazepinas en orina, por cromatografía en capa fina. Provincia de Chimborazo al laboratorio de Química Forense del departamento de Criminalística de la policía judicial de Chimborazo, cuyo objetivo fue determinar la presencia de benzodiazepinas en muestras de orina, mediante el método de cromatografía en capa fina, de manera que sirvan de ayuda al diagnóstico médico. El estudio fue realizado durante un periodo de 6 meses, en los cuales debido al uso del método de extracción líquido-líquido, se obtuvo un alto grado de concentración del tóxico y

posteriormente resultados satisfactorios durante el análisis por cromatografía en capa fina (prueba cualitativa confirmatoria), para la identificación de los compuestos benzodiazepínicos (4)

Linares Rebollo M, México (2013) en su tesis doctoral: Identificación de metabolitos de benzodiazepinas en orina mediante las técnicas de inmunoensayo y GC /ms, Universidad Nacional Autónoma de México; 2013. Tuvo como objetivo elaborar una revisión de manuales, libros, revistas, de manera tanto física como electrónica, de las técnicas de inmunoensayo, cromatografía de gas y espectrometría de masas (GC/MS) utilizadas en la identificación de benzodiazepinas y sus metabolitos en la orina. Método: analítico, observacional. Conclusiones: la GC/MS es una prueba determinante para el análisis de benzodiazepinas y sus metabolitos en fluidos biológicos y son consideradas técnicas validas confirmatorias con reconocimiento internacional en el análisis toxicológico. (8)

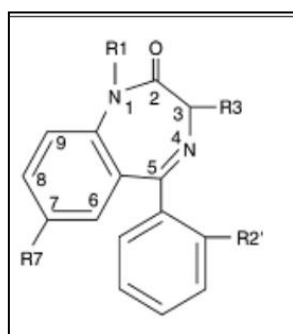
Flores Fuentealba D, Chile (2013) en su tesis doctoral, "Validación de una metodología analítica para la determinación de Diazepam y Nordiazepam en sangre, por cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones, previa extracción en fase sólida, en la unidad de toxicología en el Servicio Médico Legal de Temuco". Su Objetivo: validar la metodología analítica utilizada por el Servicio Médico Legal para la determinación de Diazepam y su metabolito Nordiazepam, gracias a un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de captura de electrones. Se utilizó la extracción en fase sólida. Se evaluó la selectividad, linealidad instrumental y del método, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación. (9)

## 2.2 Bases Teóricas

### 2.2.1 Benzodiazepinas

Las benzodiazepinas son fármacos que actúan sobre receptores específicos en el cerebro, estos receptores pertenecen al complejo ácido gamma amino butírico (GABA), encargado a su vez de inhibir al sistema nervioso central. (4).

La estructura de las benzodiazepinas se distingue por poseer un anillo heterocíclico en el que se encuentran dos átomos de nitrógeno. Sobre esta estructura base aparecen las benzodiazepinas, diferenciadas únicamente por los sustituyentes de estas posiciones. (2, 9)



**Figura 1. Estructura Química de las Benzodiazepinas**

### 2.2.2 Farmacología

A pesar de la similitud en el perfil farmacológico de todas las benzodiazepinas en general, suelen ser más o menos selectivos de acuerdo a los receptores que se encuentren involucrados, gracias a lo cual son seleccionados para cubrir distintas patologías. (3)

### **2.2.3 Farmacocinética**

La administración de estos fármacos suele ser oral, absorbiéndose por completo hasta en un máximo de 6 horas, si lo que se requiere es una acción rápida, se suele emplear la vía intravenosa en casos de urgencia. Al ingresar al torrente sanguíneo, las benzodiazepinas se unen a proteínas plasmáticas en diferentes cantidades, siendo en el caso del diazepam entre un 98 a 99%. La acción farmacológica puede corresponder a la droga en sí y también a la droga más la acción de su metabolito, como es el caso del Diazepam y su metabolito el Nordiazepam. Existen casos como el del cloracetato, en que el jugo gástrico modifica su estructura química para convertirlo en Nordiazepam, que es la sustancia que finalmente llegará al torrente sanguíneo y será responsable del efecto. (2)

El metabolismo de las benzodiazepinas suele darse en el hígado, muchos de sus metabolitos activos se biotransforman de forma lenta, por lo que la duración del efecto puede guardar poca relación con el tiempo de vida media. Sin duda alguna, la velocidad de eliminación de una benzodiazepina tiene una gran importancia, pues ésta determina la duración de sus efectos. Sin embargo, por lo general, la duración de los efectos que se observan es considerablemente menor que la vida media de duración. En el caso de la mayoría de las benzodiazepinas, los efectos visibles generalmente desaparecen después de pocas horas. (2)

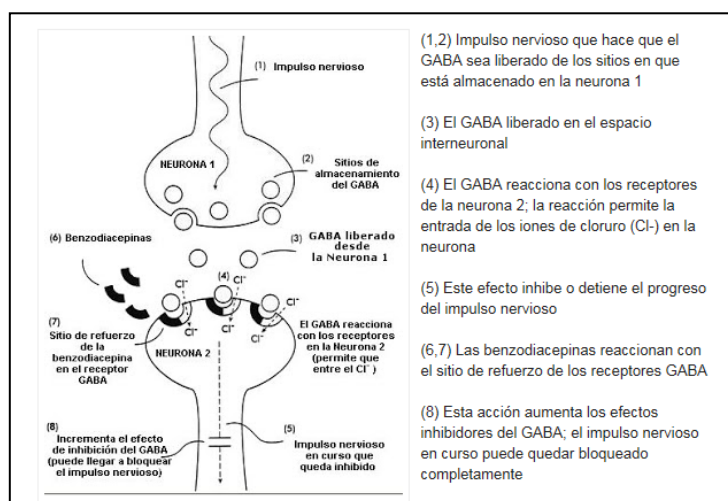
### **2.2.4 Mecanismo de acción**

Las benzodiazepinas son agonistas indirectos del GABA. El GABA es un neurotransmisor con acción inhibitoria sobre el SNC, que posee receptores distribuidos en el cerebro, médula espinal, riñones, glándula pineal, glándulas adrenales y plaquetas. Estos receptores,

ubicados en la parte exterior de la neurona con la cual la benzodiacepina reaccionará, abren un canal que permite a las partículas con carga negativa (iones de cloruro) entrar en la neurona. Estos iones negativos "sobrecargan" la neurona, debilitando la respuesta de la misma a otros neurotransmisores que, en condiciones normales, la excitarían.

La combinación de una benzodiacepina con su receptor potencia la acción del GABA, permite que ingrese a las neuronas una mayor cantidad de iones de cloruro, aumentando así la resistencia de la neurona a la excitación. Los distintos subtipos de receptores benzodiacepínicos tienen acciones levemente distintas.

Uno de estos subtipos, (el alfa 1) es el responsable de los efectos sedativos, otro (el alfa 2) es el que ejerce efectos ansiolíticos, mientras que ambos, el alfa 1 y el alfa 2, como también el alfa 5, son los responsables de los efectos anticonvulsivos. Todas las benzodiacepinas se combinan con todos estos subtipos y todas aumentan la actividad del GABA en el cerebro. (2, 5,9)



**Figura 2. Mecanismo de acción de las Benzodiacepinas.**

La administración de algún tipo de benzodiazepina, produce un aumento en la actividad de inhibición del GABA, lo que produce un decremento de la génesis de los neurotransmisores excitativos, lo que al mismo tiempo produce disminución en la formación de otros neurotransmisores como la norepinefrina, dopamina y de la serotonina.

Los neurotransmisores mencionados líneas arriba, son fundamentales para el cumplimiento de las funciones que corresponden a estado de alerta y vigilia, así como del tono muscular y de la coordinación. Otras funciones están asociadas a nivel cardiovascular (ritmo cardíaco y presión sanguínea), la estimulación y secreción de las glándulas endocrinas, todas ellas alterando su función frente a la ingesta de benzodiazepinas. Otro tipo de receptores benzodiazepínicos (renal, sanguíneo) pueden verse afectados siendo ello el causal de algunos efectos no deseados. (2,4)

### 2.2.5 Clasificación

- a) **De acción ultracorta:** Se suele colocar al Brotizolam en este grupo, aunque pueden incluirse a un número reducido de metabolitos de las benzodiazepinas con poca o nula actividad farmacológica. (2)
- b) **De acción corta:** Reaccionan con el ácido glucurónico, por lo que puedan ser excretados a través de la orina. Se incluyen el alprazolam, midazolam, lorazepam, etc. (2)
- c) **De acción intermedia:** En su mayoría carecen de metabolitos activos, de modo que el compuesto administrado es el responsable

de la actividad farmacológica. Encontramos al clonazepam y bromazepam, etc. (2)

- d) **De acción larga:** Su vida media suele ir de 24 horas a más, esto proviene tanto del compuesto administrado como de sus metabolitos farmacológicamente activos. En este grupo encontramos al clobazam, cloracetato, diazepam, clordiacepóxido, etc. (2)

### 2.2.6 Usos terapéuticos

Las benzodiazepinas tiene una amplia variedad de usos terapéuticos entre los que sobresalen los siguientes: ansiolítico, hipnótico, anticonvulsivantes, relajantes y depresores antes de cirugías u otros procedimientos quirúrgicos, trastornos musculares, dependencia alcohólica, etc. (4,5)

### 2.2.7 Efectos adversos

Las reacciones adversas incluyen: sedación y somnolencia, disminución de la atención, disminución de la agudeza mental y de la coordinación muscular, por lo que se sugiere extrema precaución en pacientes que manejan o que trabajan con máquinas potencialmente peligrosas. Otras acciones inespecíficas de las benzodiazepinas son: aumento de peso, dolor de cabeza, reacciones alérgicas cutáneas, irregularidades menstruales y alteraciones de la función sexual. (2, 4,5)

Existe riesgo de presentar tolerancia y dependencia a estos fármacos debido a la administración repetida de los mismos, esto incluso a dosis usuales terapéuticas. La dependencia a las



benzodiazepinas suele ser notada debido a la aparición de síntomas de abstinencia cuando la dosis es reducida o se suprime el tratamiento. Entre los síntomas que pueden aparecer están la ansiedad, depresión, problemas de concentración, insomnio, dolor de cabeza, mareos, zumbido de oídos, pérdida de apetito, temblores, sudoración, irritabilidad, alteraciones de la percepción, náuseas, vómitos, calambres abdominales, palpitaciones, hipertensión sistólica leve, taquicardia e hipotensión ortostática, entre otros. (2,4)

### **2.2.8 Diazepam**

Es un derivado benzodiazepínicos que deprime el SNC, que actúa como relajante, contra la ansiedad, como tranquilizante e indicado en episodios convulsivos. Es una benzodiazepina de vida media larga con gran eficacia como relajante muscular, el cual se maneja a nivel hospitalario como extra hospitalario, además de ser empleado en los casos de ansiedad. (12)

Es un depresor del sistema nervioso, que puede generalmente llevar desde una somnolencia, pasando por letargia, estupor y coma, llegando en casos extremos a causar la muerte, sobre todo cuando se sinergiza con otros depresores como el alcohol, causando sinergismo de potenciación, todo ello dependiendo de diversos factores como tolerancia y dosis.

Está demostrada su utilidad como miorrelajantes muscular originados por algún tipo de trauma, otra propiedad farmacológica indica que se emplea en convulsiones por lo que está indicado en trastornos convulsivos (12)

Se considera que su mecanismo de acción es el mismo para todo el grupo de benzodiazepinas y consiste en potenciar o facilitar la acción inhibitoria del neurotransmisor ácido gamma amino butírico (GABA), mediador químico de la inhibición tanto en el nivel del botón pre sináptico como pos sináptico, en todas las regiones del sistema nervioso central. (12)

### **2.2.9 Clonazepam**

Actúa sobre el sistema nervioso central, con propiedades ansiolíticas, anti convulsionantes, miorelajantes, sedantes, hipnóticas y estabilizadoras del estado de ánimo. Posee también tiene un efecto estabilizador del estado de ánimo, causa olvido temporal y puede ser adictivo y producir alta tolerancia, al igual que el resto de las benzodiazepinas, generalmente se administra por períodos breves o en casos de urgencia en pacientes que padecen trastorno bipolar. (13, 14)

Al ser un depresor de las funciones del sistema nervioso central. Paralelamente a su efecto anticonvulsivo produce cansancio y debilidad no habituales, somnolencia, relajación de la musculatura, sensación de mareo, trastornos del equilibrio, inseguridad motriz y dificultades en la coordinación psicomotora, retardo en los tiempos de reacción ante un estímulo y deterioro en las funciones cognitivas (principalmente amnesia anterógrada y dificultades de atención y concentración).

Con menor frecuencia, se describen también efectos que parecen apuntar a la dirección opuesta del perseguido efecto relajante y ansiolítico, tales como excitabilidad, nerviosismo, inquietud, comportamiento agresivo u hostil, estados de pánico, trastornos del sueño, pesadillas, etc. (13, 14)

### **2.2.10 Alprazolam**

Se utiliza la terapia clínica como una de las drogas más efectivas para el tratamiento de desórdenes de ansiedad. En dosis equivalentes es de 5 a 15 veces más potente que el diazepam. (14,15)

Por su rápido metabolismo y excreción (posee un comienzo de acción más rápido y una acción más reducida que diazepam, con efectos sedantes poco prolongados), por lo cual ha sido llamada benzodiazepina de tiempo de vida media intermedio. La absorción de la droga es rápida y compleja, las concentraciones máximas en plasma se alcanzan entre la primera y segunda hora (14,15).

### **2.2.11 Rutas Metabólicas de Benzodiazepinas.**

Las benzodiazepinas se metabolizan a través de la superfamilia conocida como citocromo P-450. Esta familia es la ruta más importante de las reacciones de biotransformación, está compuesta de al menos 14 familias de genes P-450. Muchas benzodiazepinas se metabolizan exclusivamente por la vía conocida como CYP3A, su actividad varía mucho entre individuos. También se encuentra en el tracto gastrointestinal. El Midazolam, por ejemplo, es un medicamento metabolizado exclusivamente por esta enzima, se usa como marcador de la actividad de esta enzima en los seres humanos. La biotransformación ocurre principalmente a nivel de los microsomas hepáticos: oxidación, desmetilación, hidroxilación, desalquilación, conjugación con ácido glucurónico. (16, 17)

El metabolismo hepático difiere entre las diferentes benzodiazepinas; algunas tienen que pasar tanto por fase I-II, como Diazepam, Clordiazepóxido, Flurazepam, Triazolam, Midazolam y Clonazepam,

otras como Lorazepam, Oxacepam y Temacepam sólo precisan de la fase II. En Fase I, mediante la vía oxidativa, se produce la hidroxilación o N-desalquilación por parte del sistema enzimático citocromo P-450, oxidando metabolitos farmacológicamente activos. La Fase II consiste en una conjugación de grupos hidroxilos y aminos para formar compuestos inactivos que son excretados por la orina. La mayoría de los casos, los metabolitos de la fase I tienen una actividad biológica que puede ser más grande o menor que el compuesto original. Algunas benzodiazepinas pueden ser considerados profármacos o prodrogas. (16, 17)

Además, la fase I es una vía cuya actividad depende de varios factores: puede estar disminuida su actividad por la edad, enfermedades hepáticas. Por el contrario, es activada por el humo del tabaco o la administración simultánea de fármacos que estimulan la activación del sistema del citocromo P-450 como el fenobarbital. Por el contrario, la fase II de conjugación es más estable y no es afectada por todos los factores anteriores. (16, 17)

La enzima CYP3A, sólo metaboliza parcialmente el Diazepam y el Flunitrazepam. Aproximadamente 40% (o más en el caso del Flunitrazepam) se metaboliza por la vía de la enzima denominada CYP2C19. (16, 17)

La duración de su acción depende de la liposolubilidad de cada compuesto, si los compuestos son más lipofílicos tienen una acción más corta, ya que tienden a repartirse rápidamente entre la sangre y el cerebro. (16)

Las benzodiazepinas y sus metabolitos activos se fijan a las proteínas plasmáticas en un porcentaje muy alto (85-99%). (16)

**Tabla 1. Metabolitos de diazepam, clonazepam y alprazolam**

<b>Benzodiacepinas</b>	<b>Metabolitos</b>
Diazepam	Nordiazepam, Oxacepam
Clonazepam	7-Aminoclonazepam
Alprazolam	$\alpha$ Hidroxialprazolam

Fuente: Hurlé MA, Monti J, Flores J. Farmacología Humana. 5ª ed. España. Elsevier Masson. (43)

### **2.2.12 Validación**

#### **a. Definición**

La validación de un método de ensayo es imprescindible para la obtención de resultados, los mismos que deben contar con exactitud y confiabilidad a fin de que los resultados que sean exactos y confiables.

La literatura científica ofrece mucha información relevante, sobre todo en técnicas y métodos sobre analítica cualicuantitativa, donde en algunas oportunidades no son empleados de manera correcta. Los procesos de validación siguen procedimientos y protocolos, ya que los laboratorios de referencia deben cumplir con ciertas normativas.

La validación de los métodos es importante ya que, aplicando métodos preventivos, correctivos y validación, incrementa el nivel de confiabilidad en los resultados analíticos. (18)

#### **b. Validación de los métodos analíticos**

Es el proceso realizado para definir un requisito (por ejemplo, un requisito analítico) y confiar en el método de ensayo tomando en consideración que posee las capacidades requeridas para su ejecución. De acuerdo con la norma ISO 8402 se define la

validación como la “confirmación mediante examen y provisión de evidencias objetivas que se cumple los requisitos particulares para su uso específico” (17). Ello resulta de vital importancia porque permite evaluar la capacidad de desempeño del método; en el pasado la validación del método se concentraba únicamente en el proceso de evaluación de los parámetros de desempeño del método, los cuales son llevados a cabo mediante el uso comprobado de equipos que se encuentren en óptimas condiciones dentro de su especificación y adecuadamente calibrados. De la misma manera, la persona encargada de realizar los estudios debe ser competente y sus conocimientos en el campo de trabajo deben facilitarle la toma de decisiones inherentes a las observaciones realizadas y a los progresos del estudio. (19,20)

**c. Características de un estudio de validación del método**

Los estudios de validación deben ser representativos. En otras palabras, se debe obtener una estimación realista de la cantidad y la gama de efectos que ocurran durante la realización del método, y de la misma manera debe estudiarse todo lo que abarca el método, desde las concentraciones hasta los tipos de muestra. (20).

Tenemos que tomar en cuenta nuestros parámetros dentro de dos tipos, los parámetros continuos medibles y los discontinuos. Para los primeros se permite una incertidumbre determinada o un rango esperado; mientras que para los segundos se deben tomar en cuenta los niveles del factor permitidos o hallados durante el uso normal del método. Si bien el rango de valores debería ser amplio; lamentablemente, no es económicamente viable disponer de la variación completa de muchos factores o muchos niveles.

Debemos considerar como ejemplo que, dos determinaciones de cada variación durante cinco días ofrecerán una mejor estimación de la fidelidad intermedia que cinco determinaciones de cada una durante dos días, y en este contexto, diez determinaciones individuales en días separados serían todavía mejor, aunque no ofrecería información adicional sobre la repetibilidad día a día.  
(20)

**d. Proceso de Validación del método analítico**

Plasmado en una fase de experimento que cumple con lo siguiente:

▪ **Especificidad:**

Es una condición que posee el método analítico para medir de manera específica al analito, sin interferencias de impurezas, desechos u otras sustancias que estén contenidas en una determinada muestra. Se expresa como el grado de inexactitud del método. La evolución de esta condición es de suma importancia para los métodos de análisis que se ensayan en la cuantificación de los analitos basados en formulas y estabilidad. (21,22)

▪ **Precisión:**

Sirve para conocer qué tan cerca se encuentran los valores en nuestro estudio, se emplea la desviación estándar, referido a la dispersión de los datos hallados, por lo que se debe utilizar diferentes analistas y equipos diversos con el único objetivo de tener resultados iguales, empleando para ello una misma

técnica y método, por lo que la reproducibilidad representa el mejor resultado. (21,22)

- **Repetibilidad:**

Repetir un resultado indica al analista la precisión y exactitud de un resultado basado en un método analítico, ya que al haber sido desarrollado bajo los mismos parámetros y analizando la misma muestra problema, por el mismo operador, en la misma área y empleando el mismo equipo y insumos químicos se obtiene el mismo resultado. Se utiliza la desviación estándar como parámetro estadístico, lo que evalúa el grado de incertidumbre, lo que significa los errores analíticos en relación a los niveles de dispersión de los valores a partir de una media. (23,24)

- **Reproducibilidad:**

Es una forma de medida asociada a la precisión que se obtienen en los resultados de laboratorio a partir de una determinada muestra, y que al ser ensayados por diferentes operadores analistas en tiempos distintos indican la misma respuesta matemática, lo que demuestra la repetibilidad. (23,24)

- **Linealidad:**

Permite desarrollar resultados en relación a la concentración o cuantificación de un compuesto químico (analito) en un determinado límite, que sea directamente proporcional a la cuantificación del analito en un rango establecido. Se obtiene por medio del tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o



concentraciones. La selección del rango y el número de puntos experimentales está directamente relacionada con la aplicación del método. (25,26)

- **Recuperación**

El porcentaje de recuperación es el cociente entre la cantidad de analito medida y el contenido en la muestra. El resultado ideal es 100%. Para calcular la recuperación se agregan a la muestra antes del tratamiento cantidades sucesivas del analito y se determinan contra una calibración base. Los resultados se grafican contra las agregadas. (27)

- **Robustez**

La robustez es la resistencia al cambio observable en los resultados que se obtienen por una determinada metodología analítica, siempre que existan desviaciones inferiores a las detalladas en el procedimiento. Los límites de los parámetros experimentales deben especificarse en el protocolo del método, y dichas desviaciones permisibles, no deben producir cambios significativos en los resultados obtenidos (un cambio significativo implica que el método no puede funcionar dentro de los límites de incertidumbre que definen la adecuación al propósito). (28)

### **2.2.13 Cromatografía en capa fina**

- a. **Definición**

La cromatografía es “el método usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes son

distribuidos entre dos fases, una de las cuales es fase estacionaria, mientras la otra es móvil. La fase estacionaria es un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel (matriz). La fase estacionaria puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa, distribuida como una película, etc.” (29)

La característica principal de la CCF es la presentación de una capa uniforme de un adsorbente, el cual debe ser colocado sobre una placa de vidrio u otro soporte. (30)

#### **b. Fundamento**

El desarrollo de la cromatografía en capa fina se basa en la acción de la capilaridad, ya que se busca que por el método ascendente un eluyente avance de manera vertical por una placa casi, en contraste con una muestra ya conocida y que nos servirá de referencia. (30)

#### **c. Fases móviles**

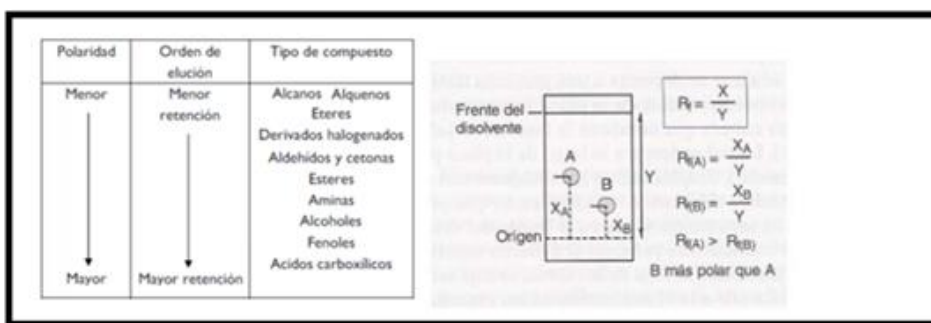
Las fases móviles están referidas a los diferentes solventes que se deben emplear para la corrida cromatográfica en la identificación de benzodiazepinas. La bibliografía consultada refiere para las benzodiazepinas fases y proporciones como éter dietílico: cloroformo 80:20, en el caso de alprazolam y diazepam; cloroformo: 2-propanol: n-heptano 50:17:33 entre otros (31)

#### **d. Determinación del R<sub>f</sub>.**

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y el fluyente desde el origen de la placa se conoce como R<sub>f</sub>, este valor es constante para cada compuesto en unas mientras se mantengan las siguientes

condiciones cromatográficas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.)

Debido a que es prácticamente imposible reproducir exactamente las condiciones experimentales, la comparación de una muestra con otra debe realizarse eluyendo ambas en la misma placa. Para calcular el Rf se aplica la siguiente expresión:  $R_f = \text{distancia recorrida por el compuesto (X)} / \text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}$ . (30)



**Figura 3. Determinación de Rf**

La caracterización de los compuestos se realiza comparando la migración (Rf) de sustancias desconocidas con la migración de un compuesto patrón. El Rf es característico de cada sustancia, y es así posible identificar los compuestos desconocidos en un determinado compuesto o fluido biológico. (32)

### 2.2.14 Toma de muestra

Las ciencias forenses están definidas como la aplicación de las ciencias a los aspectos médico-legales. Una de las ciencias es la toxicología forense, la cual tiene como objeto identificar la presencia o ausencia de un xenobiótico presente en un fluido biológico o compuesto, que estuviera implicado en un hecho o delito, de consecuencias legales, por lo que se precisa de un laboratorio con

recursos humanos competitivos y con tecnología capaces de poder realizar los exámenes analíticos con la mayor confiabilidad. (30).

El laboratorio de toxicología es de gran importancia por la implicancia médico legal al detectarse diversas drogas de abuso, alcohol y medicamentos psicotrópicos, que son capaces de modificar la conducta de las personas y alterar la percepción de la realidad, y pueden modificar su estado de conciencia, que llegan a tener consecuencias legales. (32)

Las muestras biológicas en toxicología forense incluyen sangre, orina, semen, riñón, cerebro, hígado, bilis, contenidos gástricos, intestino, bazo, pulmón, huesos y más recientemente cabello, uñas, saliva y sudor.

También son fundamentales en casos de agresión sexual, las muestras de contenido vaginal y/o rectal, así como las prendas íntimas más cercanas o en contacto con estos fluidos, pues permiten situar al sospechoso en el lugar del hecho e identificarlo, a través de la realización de diversos estudios. (33)

La selección, preparación y remisión de la muestra debe hacerse siguiendo protocolos y procedimientos consignados en diferentes laboratorios toxicológicos forenses, por lo que deben seguirse una rigurosa sistemática para tal fin, de manera que esté garantizada la veracidad de los resultados aportados a los tribunales. (34)

La muestra biológica de orina es idónea para realizar un estudio de screening cuando no se conoce el origen de la intoxicación ya que todo medicamento o droga es excretado en mayor o menor medida por la vía renal, ya sea en forma de compuesto inalterado o en forma de diversos metabolitos. Generalmente se emplea en la detección de consumo de sustancias ilícitas en trabajadores o en casos de dopaje

en el deporte. Sin embargo, un resultado positivo solo indicará el consumo de la sustancia detectada, independientemente del nivel obtenido. Las ventajas de esta muestra es que la concentración del analito puede ser mayor que en sangre, además la orina está exenta de proteínas, con lo cual se tienen menos interferencias, y es una muestra abundante, fácil de recolectar y de conservar. (33)

La toma de muestra está definida como la obtención parcial de un todo; representativo y cumpliendo con procedimientos establecidos que permitan realizar la determinación de una sustancia mediante el análisis toxicológico. Las muestras analizadas fueron muestras de orina, los cuales fueron recolectados entre 50 – 100 ml (33).

### **2.2.15 Recolección de muestras**

La obtención de muestras sigue un protocolo para tener los mejores resultados. La colección y almacenamiento, seguida de cadena de frío, garantiza la validez de la toma de muestra en personas previa administración de benzodiazepinas. (30)

- **Proceso de extracción de tóxicos en orina**

Como forma general, los tóxicos orgánicos se extraen con disolventes orgánicos. Entre los más frecuentes para una extracción general se encuentran el éter etílico, cloroformo, diclorometano, 1-butanol, entre otros. (35)

Es fundamental en este proceso el pH del medio en el que se realiza la extracción, ya que el fundamento de la extracción líquido consiste en la diferente solubilidad que cada sustancia tiene en agua y/o disolventes orgánicos en función al grado de disociación que sufre en función del pH

del medio, considerando el coeficiente de partición de acuerdo con la mayor o menor solubilidad. Los tóxicos en medio acuosos se comportan como ácidos, básicos o sustancias neutras (34). Las formas no ionizadas son más solubles en disolventes orgánicos. Por tanto, en cada caso se tiene que utilizar el pH idóneo para que el tóxico que buscamos se encuentre mayoritariamente en forma no ionizada. (35)

- **Extracción de tóxicos ácidos**

En el caso de los tóxicos ácidos, si consideramos un medio ácido, implica una elevada concentración de  $H^+$ , por lo que según el principio de Le Chatelier, la reacción se desplazaría para compensar dicho aumento hacia la izquierda, es decir, hacia la formación de AH, aumentando así la cantidad de ácido que está en forma no ionizada. La forma no ionizada es más soluble en disolventes orgánicos que la ionizada, por lo que concluimos que: “los ácidos se extraen con disolventes orgánicos en medio ácido”. (35)

- **Extracción de tóxicos básicos**

En el caso de los tóxicos básicos, si consideramos un medio alcalino, implica una elevada concentración de  $OH^-$ , por lo que según el principio de Le Chatelier, la reacción se desplazaría hacia la izquierda para compensar ese aumento, es decir, hacia la formación de OH, aumentando así la cantidad de base que está en forma no ionizada. La forma no ionizada es más soluble en disolvente orgánico que la ionizada, por lo que concluimos que: Las bases se extraen con disolventes orgánicos en medio alcalinos. (35)

### **2.2.16 Análisis toxicológico orgánico**

Las muestras deben prepararse para el análisis instrumental, el objetivo principal de la preparación de la muestra es aumentar la especificidad, eliminando al máximo todas aquellas sustancias presentes en la misma que pueden interferir en el análisis. De esta manera la especificidad de un análisis no va depender únicamente del método instrumental empleado sino también del proceso de preparación al que se haya sometido la muestra. (36)

## **2.3 Formulación de la Hipótesis**

### **2.3.1 Hipótesis general**

La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de alprazolam, diazepam y clonazepam en muestras de orina, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

### **2.3.2 Hipótesis específicas**

La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de alprazolam en muestras de orina, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de diazepam en muestras de orina, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de clonazepam en muestras de orina, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

El uso correcto de los instrumentos calificados y calibrados permiten la validación de la técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de alprazolam, diazepam y clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo año 2017.

## **2.4 Variables**

### **2.4.1 Operacionalización de variables**

La operacionalización de variables consiste en determinar el método a través del cual las variables serán medidas o analizadas. La definición operacional de un concepto consiste en definir las operaciones que permiten medir ese concepto o los indicadores observables por medio de los cuales se manifiesta ese concepto. En resumen, una definición operacional puede señalar el instrumento por medio del cual se hará la medición de las variables. La definición operativa significa que es lo que va a hacer el investigador para operacionalizar la pregunta de la investigación.



**Tabla 2. Operacionalización de variables**

Variables		Operacionalización de variables	Dimensiones	Indicadores
<b>Variable independiente</b>	Validación de una técnica analítica por CCF	La identificación de alprazolam, diazepam y clonazepam se realiza por un método analítico (CCF), el cual será validado por juicio de expertos	Técnica analítica por CCF	Identificación de alprazolam, diazepam y clonazepam
<b>Variable dependiente</b>	Identificación de alprazolam, diazepam y clonazepam		Presencia o ausencia de alprazolam, diazepam y clonazepam	Reactivos reveladores selectivos  Validación por juicio de expertos

## 2.5 Marco Conceptual

**Benzodiacepinas:** son sustancias depresoras del sistema nervioso central, que pueden afectar la voluntad de las personas y provocar somnolencia, hipnosis y coma inclusive dependiendo la dosificación y el sinergismo que provoca cuando se administra con otro depresor como el alcohol. (41)

**Cromatografía:** es un método que permite separar diversos componentes de una determinada muestra, lo que está determinado por la separación de los mismos a través de una fase estacionaria conjuntamente con la fase móvil, donde cada componente interactúa de manera diversa, donde interviene de forma particular la polaridad de las sustancias (39)

**Cromatografía en capa fina:** es un método físico de separación de diversos componentes de una muestra problema, el cual permite separar los componentes químicos empleando una fase móvil y una fase

estacionaria, utilizando para ello métodos de identificación como UV, vapores de iodo, reactivos de identificación, Rf, que identifica sustancias y metabolitos mediante la visualización de manchas, donde la longitud de la placa cromatográfica determina una mejor separación de todos los constituyentes de la muestras, donde interviene además la capilaridad y polaridad de la sustancias. (40).

**Metabolito:** es un compuesto farmacológico-toxicológico producto del proceso de biotransformación de una sustancia, para luego ser eliminada como compuesto polar (42)

**Técnica analítica:** La técnica analítica está referida a los procedimientos empleados para desarrollar un determinado análisis químico y consigna a las técnicas cromatográficas, espectroscópicas, inmunoensayos, entre otros. (38).

**Validación:** Según Fernández et al, revista cubana (2002), está definido como un proceso analítico empleado para validar un método analítico, el cual debe ser documentado, demostrado y que sea reproducible, donde los resultados de la validación se emplean para la fiabilidad de los resultados analíticos (37)

## CAPÍTULO III: MÉTODO

### 3.1 Tipo de estudio

La investigación que se realizará será de tipo cualitativo, ya que se analizará la causa y efecto que generarán las variables propuestas en el presente estudio. Para ello, se manipulará de manera intencionada la variable independiente para luego analizar las consecuencias de manipulación que se generarán en la variable dependiente.

### 3.2 Diseño a utilizar

Con respecto a esta investigación, se podría decir que tiene un diseño experimental, de tipo “cuasi experimental”. Donde se tendrá un grupo control y uno experimental

### 3.3 La población y muestra

Se empleó la siguiente fórmula:

$$n: \frac{(z^2) (p) (q) (N)}{E^2(N-1) + (Z^2) (p) (q)}$$

Dónde:

n: es el tamaño de la muestra.

N: tamaño de la población: 75

E: Error máximo aceptable: 0.05

Z: Nivel de confianza: 95 %

$$n: \frac{(1,96^2) (0.5) (0.5) (75)}{0.05^2(80-1) + (1,96^2) (0,5) (0,5)}$$

n: 62

Para una mayor factibilidad el número de muestra a analizar será de 60 fluidos (orina) de pacientes adultos voluntarios con medicación de benzodiacepinas en el Hospital Dos de Mayo, quienes fueron medicados con diferentes benzodiacepinas, cuya distribución es la siguiente:

**Tabla 3. Distribución de muestras de orina con previa medicación de benzodiacepinas.**

<b>Benzodiace-pina</b>	<b>Concentración</b>	<b>Forma Farmacéutica</b>	<b>N° de lote</b>	<b>Fecha de vencimiento</b>	<b>N° de muestras</b>	<b>%</b>
Alprazolam	0.5 mg	Tableta	10985797	Set-2020	20	33.3%
Diazepam	10 mg	Tableta	10309047	Mar-2018	20	33.3%
Clonazepam	0.5 mg	Tableta	10858007	Ago-2020	20	33.3%
Total					60	100.0%

Fuente: Elaborado propio del investigador

### 3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

El método empleado para identificación de las benzodiacepinas lo constituye la CCP (cromatografía de capa fina), método físico capaz de identificar metabolitos mediante la visualización de manchas y con el uso de reactivos. La recolección de datos se hará mediante fichas bibliográficas donde se registre o codifique las muestras de orina de personas con consumo previo de alprazolam, clonazepam y diazepam. Se

emplearán programas como Excel o SPSS 22 y se realizará la interpretación de los resultados que servirán para plasmar los resultados en gráficos, barras, o columnas. El método será validado por profesionales especialistas en el área, que haya o se encuentre laborando en el área de toxicología forense.

## **Parte Experimental**

### **Material, equipo y reactivos**

#### **Material de laboratorio**

- Fiolas de 100 mL
- Embudos de decantación de 100 mL
- Papel de tornasol
- Explayador - pulverizador
- Vasos de precipitación
- Baguetas
- Pipetas de 1 mL y 5 mL
- Capilares
- Frasco vial de vidrio de 5 mL
- Embudos
- Papel filtro
- Placas cromatográficas
- Probetas de 100 mL

#### **Reactivos**

- Cloroformo q.p.
- Acetona q.p.
- Trietanolamina al 1%
- Ácido clorhídrico al 10%
- Éter di etílico q.p.
- Amoniaco q.p.
- Vainillina (vainillina más ácido sulfúrico).
- Ácido Sulfúrico q.p.

- Agua destilada
- Fast Blue
- Reactivo de Dragendorff (subnitrito de bismuto más ioduro de potasio)
- Hidróxido de Sodio al 5%
- Iodoplatinato

### **Procedimiento**

1. Recolectar muestra de orina en 50 – 100 ml aproximadamente de paciente que ha consumido previamente benzodicepinas.
2. Conservar y trasladar al laboratorio con cadena de frío (2 a 8° C)
3. Agregar ácido clorhídrico al 10%, luego colocarlo en Baño María por 24 horas. Filtrar la muestra (solución acuosa).
4. Verter la solución acuosa a la pera de decantación, agregar éter (15 ml), homogenizar la muestra y dejar en reposo por 20 min. Separadas las fases colectar la solución acuosa en un Beacker y recibir la fracción ácida en un frasco vial (rotular como fase ácida)
5. A la fase acuosa anterior, agregar amoniaco c.s.p, llevarlo a un pH alcalino (8 – 8.5), verter en la pera de decantación agregando éter (15 ml).
6. Homogenizar la muestra, reposo por 20 min, retirar la fase acuosa en un Beacker, y en un frasco vía receptuar la fase orgánica (rotular como fase alcalina)
7. Evaporar a sequedad las muestras en una campana extractora.
8. Sembrar las muestras y estándares (Alprazolam, diazepam, clonazepam) en una placa cromatográfica
9. Dejar correr las placas en fase móvil hasta una recorrida aproximadamente.
10. Retirar la placa de la cuba, secar.
11. Visualizar la placa cromatográfica en un espectro UV y revelar con los reactivos reveladores.

### **3.5 Procesamiento de datos**

Se empleó una base de datos y los resultados fueron presentados en cuadros, tablas, barras y gráficos haciéndose un análisis de los resultados. En la recolección de datos se hizo un registro de las muestras obtenidas para la identificación de las mismas, las cuales fueron obtenidas en el periodo descrito.

## **CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS**

### **4.1 Presentación de resultados**

Se empleó el software SPSS 22 y se realizó la interpretación de los resultados que sirve para plasmar los resultados en gráficos, barras o columnas. Los resultados fueron presentados en cuadros, tablas, barras y gráficos haciéndose un análisis de los resultados. La recolección de datos fue mediante un registro de las muestras obtenidas para la identificación de las mismas, obtenidas en el periodo descrito.



**Tabla 4. Identificación general de benzodiazepinas, evaluadores 1, 2 y 3 seguido de los Rf**

	ALPRAZOLAN						DIAZEPAM						CLONAZEPAM					
	EV. 1	Rf	EV.2	Rf	EV. 3	Rf	EV. 1	Rf	EV.2	Rf	EV. 3	Rf	EV. 1	Rf	EV.2	Rf	EV. 3	Rf
<b>M1</b>	SI	0.821	SI	0.821	SI	0.821	SI	0.845	SI	0.845	SI	0.845	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M2</b>	SI	0.828	SI	0.828	SI	0.828	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M3</b>	SI	0.832	SI	0.832	SI	0.832	NO	—	NO	—	NO	—	SI	0.85	NO	—	NO	—
<b>M4</b>	SI	0.833	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M5</b>	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M6</b>	SI	0.827	SI	0.827	SI	0.827	NO	—	SI	0.845	NO	—	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M7</b>	SI	0.814	SI	0.814	SI	0.814	SI	0.846	SI	0.846	SI	0.846	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M8</b>	SI	0.834	SI	0.834	NO	—	SI	0.836	SI	0.836	SI	0.836	SI	0.85	SI	0.85	NO	—
<b>M9</b>	NO	—	NO	—	NO	—	SI	0.837	SI	0.837	SI	0.837	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M10</b>	SI	0.8338	SI	0.8338	SI	0.8338	SI	0.845	SI	0.845	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M11</b>	SI	0.847	SI	0.847	SI	0.847	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M12</b>	NO	—	NO	—	NO	—	SI	0.855	SI	0.855	SI	0.855	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M13</b>	NO	—	SI	—	SI	—	SI	0.853	SI	0.853	SI	0.853	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M14</b>	SI	0.815	SI	0.815	SI	0.815	SI	0.831	SI	0.831	SI	0.831	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M15</b>	SI	0.823	SI	0.823	NO	—	SI	0.832	NO	—	NO	—	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M16</b>	SI	0.833	SI	0.833	SI	0.833	NO	—	NO	—	NO	—	SI	0.85	SI	0.85	NO	—
<b>M17</b>	SI	0.838	SI	0.838	SI	0.838	SI	0.846	SI	0.846	SI	0.846	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M18</b>	SI	0.842	SI	0.842	SI	0.842	SI	0.847	SI	0.847	SI	0.847	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M19</b>	SI	0.824	SI	0.824	SI	0.824	SI	0.831	SI	0.831	NO	—	SI	0.85	NO	—	NO	—
<b>M20</b>	SI	0.823	SI	0.823	SI	0.823	SI	0.835	SI	0.835	SI	0.835	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85

**M1:** NUMERO DE MUESTRA  
**EV.1:** EVALUADOR N° 01

**SI:** SI IDENTIFICA BDZ  
**EV.2:** EVALUADOR N° 02

**NO:** NO IDENTIFICA BDZ  
**EV.3:** EVALUADOR N° 03

**Tabla 5. Identificación de alprazolam, evaluador 1, 2,3 y su Rf**

	<b>ALPRAZOLAM</b>					
	<b>EV. 1</b>	<b>Rf</b>	<b>EV.2</b>	<b>Rf</b>	<b>EV. 3</b>	<b>Rf</b>
<b>M1</b>	SI	0.821	SI	0.821	SI	0.821
<b>M2</b>	SI	0.828	SI	0.828	SI	0.828
<b>M3</b>	SI	0.832	SI	0.832	SI	0.832
<b>M4</b>	SI	0.833	NO	—	NO	—
<b>M5</b>	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M6</b>	SI	0.827	SI	0.827	SI	0.827
<b>M7</b>	SI	0.814	SI	0.814	SI	0.814
<b>M8</b>	SI	0.834	SI	0.834	NO	—
<b>M9</b>	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M10</b>	SI	0.8338	SI	0.8338	SI	0.8338
<b>M11</b>	SI	0.847	SI	0.847	SI	0.847
<b>M12</b>	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M13</b>	NO	—	SI	—	SI	—
<b>M14</b>	SI	0.815	SI	0.815	SI	0.815
<b>M15</b>	SI	0.823	SI	0.823	NO	—
<b>M16</b>	SI	0.833	SI	0.833	SI	0.833
<b>M17</b>	SI	0.838	SI	0.838	SI	0.838
<b>M18</b>	SI	0.842	SI	0.842	SI	0.842
<b>M19</b>	SI	0.824	SI	0.824	SI	0.824
<b>M20</b>	SI	0.823	SI	0.823	SI	0.823

**Tabla 6. Identificación de diazepam, evaluador 1, 2, 3 y su Rf**

	<b>DIAZEPAM</b>					
	<b>EV. 1</b>	<b>Rf</b>	<b>EV.2</b>	<b>Rf</b>	<b>EV. 3</b>	<b>Rf</b>
<b>M1</b>	SI	0.845	SI	0.845	SI	0.845
<b>M2</b>	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M3</b>	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M4</b>	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M5</b>	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M6</b>	NO	—	SI	0.845	NO	—
<b>M7</b>	SI	0.846	SI	0.846	SI	0.846
<b>M8</b>	SI	0.836	SI	0.836	SI	0.836
<b>M9</b>	SI	0.837	SI	0.837	SI	0.837
<b>M10</b>	SI	0.845	SI	0.845	NO	—
<b>M11</b>	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M12</b>	SI	0.855	SI	0.855	SI	0.855
<b>M13</b>	SI	0.853	SI	0.853	SI	0.853
<b>M14</b>	SI	0.831	SI	0.831	SI	0.831
<b>M15</b>	SI	0.832	NO	—	NO	—
<b>M16</b>	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M17</b>	SI	0.846	SI	0.846	SI	0.846
<b>M18</b>	SI	0.847	SI	0.847	SI	0.847
<b>M19</b>	SI	0.831	SI	0.831	NO	—
<b>M20</b>	SI	0.835	SI	0.835	SI	0.835

**Tabla 7. Identificación de clonazepam, evaluador 1, 2, 3 y su Rf**

	<b>CLONAZEPAM</b>					
	<b>EV. 1</b>	<b>Rf</b>	<b>EV.2</b>	<b>Rf</b>	<b>EV. 3</b>	<b>Rf</b>
<b>M1</b>	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M2</b>	NO	—	NO		NO	
<b>M3</b>	SI	0.85	NO		NO	
<b>M4</b>	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M5</b>	NO	—	NO	—	NO	
<b>M6</b>	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M7</b>	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M8</b>	SI	0.85	SI	0.85	NO	—
<b>M9</b>	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M10</b>	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M11</b>	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M12</b>	NO	—	NO	—	NO	—
<b>M13</b>	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M14</b>	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M15</b>	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M16</b>	SI	0.85	SI	0.85	NO	—
<b>M17</b>	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M18</b>	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85
<b>M19</b>	SI	0.85	NO	—	NO	—
<b>M20</b>	SI	0.85	SI	0.85	SI	0.85

**Tabla 8. Fases móviles empleadas para corrida cromatografía.**

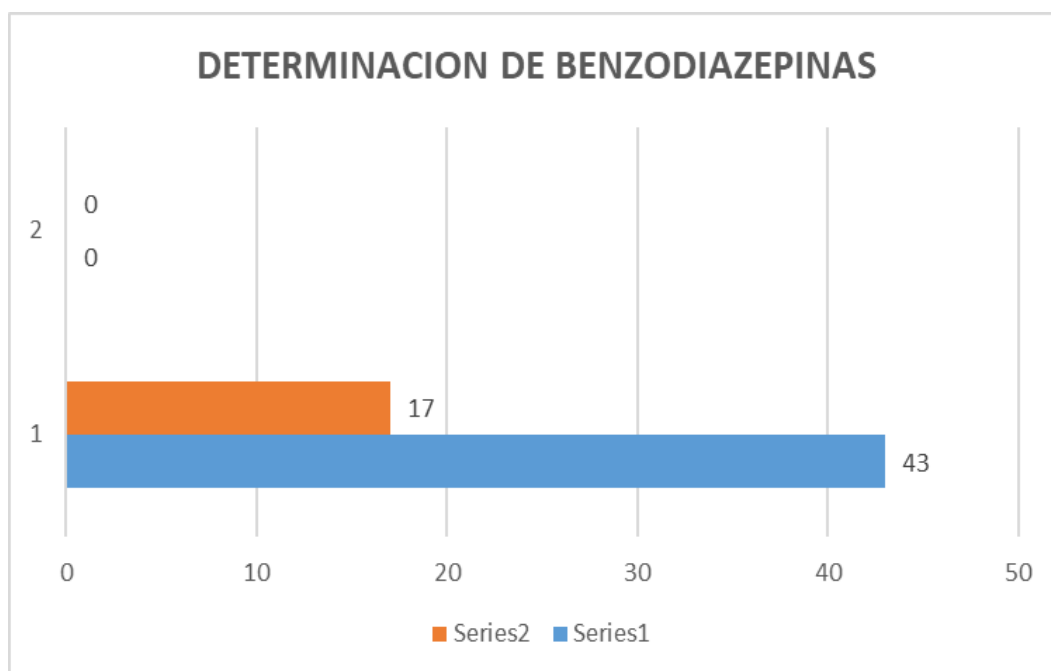
<b>FASES MOVILES</b>	<b>SOLVENTES</b>
Medio 1	Metanol, acetona, trietanolamina (1:1:0.01)
Medio 2	Metanol. Acetona (1:1)
Medio 3	Benceno, etanol (4:1)
Medio 4	Cloroformo, acetona (4:1)
Medio 5	Ciclo hexano: tolueno: di etilamina (75:15:10)
Medio 6	Cloroformo: metanol (90:10)
Medio 7	Acetato de etilo: cloroformo (1:1)
Medio 8	Metanol: amoniaco (100:1.5)
Medio 9	Cloroformo, acetona: (9:1);
Medio 10	Cloruro de metileno, acetona y etanol (4:4:2)
Medio 11	N-propanol, acetona (1:1)

Fuente: Según Clarke las diferentes sustancias químicas empleadas como fases móviles para la identificación de benzodiazepinas.

**Tabla 9 .Factores de retención de benzodiazepinas identificadas con su respectivo revelador**

<b>BENZODIAZEPINA</b>	<b>DRAGENDORFF</b>	<b>IODOPLATINATO</b>
ALPRAZOLAM	0,83	0,83
DIAZEPAM	0,84	0,84
CLONAZEPAM	0,85	0,85

Determinación de Rf del Alprazolam, diazepam y clonazepam con reveladores dragendorff y Iodoplatinato.



**Figura 4. Identificación de Benzodiazepinas**

Resultados de las muestras analizadas, reporta 43 (Positivo) y 17 (Negativo), de un total de 60 muestras.

#### 4.2 Contrastación de hipótesis

Para realizar la contrastación de hipótesis, se procedió a aplicar la medida estadística denominada coeficiente kappa de Cohen, el cual suele utilizarse para medir la concordancia en las evaluaciones entre dos evaluadores. En el caso de este estudio, se trata de establecer la validación de una nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para la identificación de benzodiazepinas en muestras de orina. Para ello, se contó con la participación de dos observadores profesionales, cuyas apreciaciones acerca de la separación e identificación de cada una de las benzodiazepinas se analizaron con el coeficiente kappa de Cohen para determinar el grado de acuerdo al que llegaron. La ecuación para k es:

$$k = \frac{\text{Pr}(a) - \text{Pr}(e)}{1 - \text{Pr}(e)}$$

Donde  $Pr(a)$  es el acuerdo observado relativo entre los observadores, y  $Pr(e)$  es la probabilidad hipotética de acuerdo por azar, utilizando los datos observados para calcular las probabilidades de que cada observador clasifique aleatoriamente cada categoría. Si los evaluadores están completamente de acuerdo, entonces  $\kappa = 1$ . Si no hay acuerdo entre los calificadores distinto al que cabría esperar por azar,  $\kappa = 0$ .

### **Contrastación de la hipótesis general**

**H<sub>0</sub>:** La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de alprazolam, diazepam y clonazepam en muestras de orina, no cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

**H<sub>1</sub>:** La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de alprazolam, diazepam y clonazepam en muestras de orina, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

**Regla de decisión:** La comprobación de la hipótesis general está dada en función de las contrastaciones realizadas con cada una de las hipótesis específicas. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula de la hipótesis general de estudio.

### **Contrastación de las hipótesis específicas**

#### **Hipótesis específica 1:**

**H<sub>0</sub>:** La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de alprazolam en muestras de orina, no cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

**H<sub>1</sub>:** La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de alprazolam en muestras de orina, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

**Nivel de significancia:**  $\alpha = 0,01$ .

**Estadística de prueba:** Coeficiente kappa (k) de Cohen = 0,737

**Estimación del p-valor:** Significación aproximada = 0,001

**Regla de decisión:** Si p-valor < 0,01, entonces k es significativo.  
 Como p-valor = 0,001 < 0,01;  
 Por tanto, k = 0,737 es significativo y se rechaza  $H_0$ .

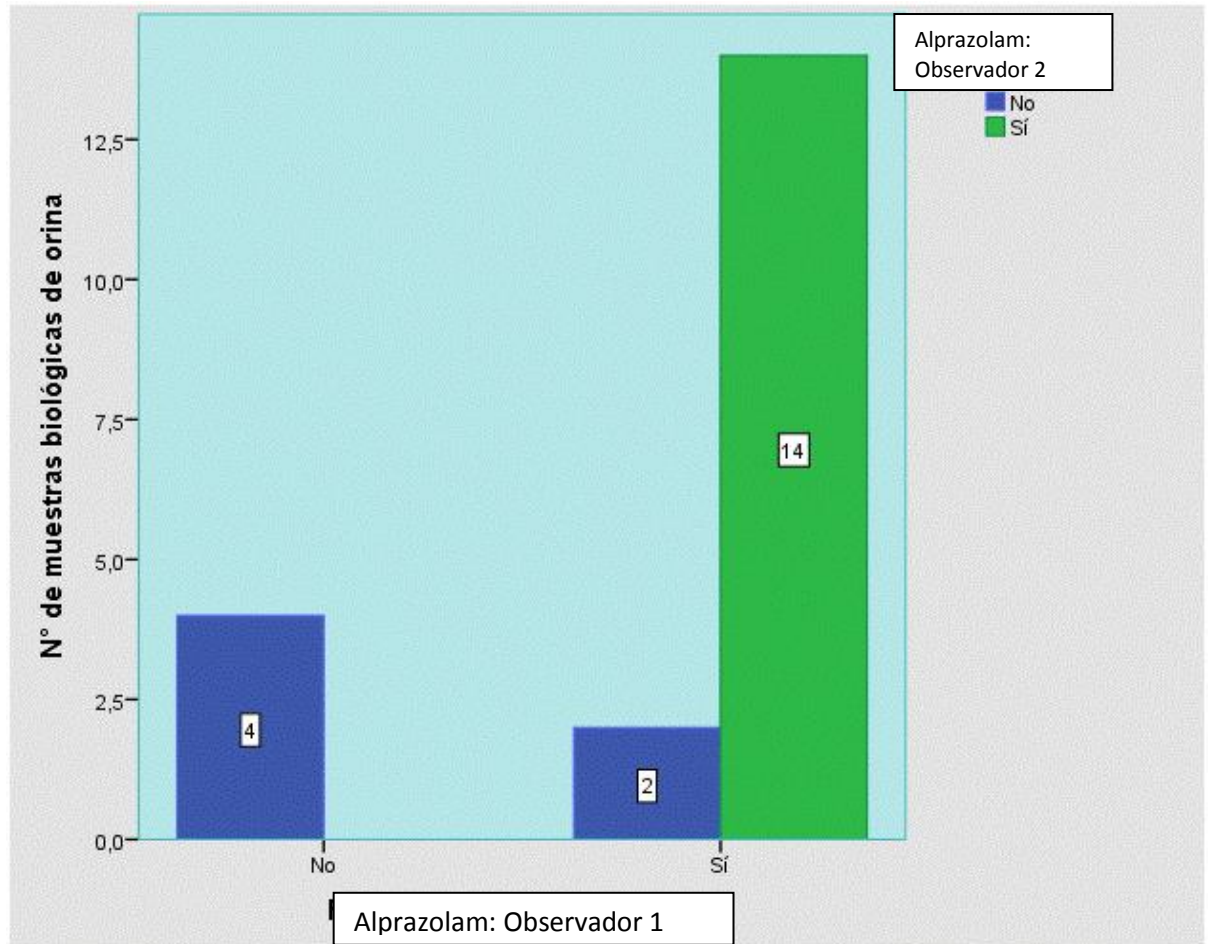
**Tabla 10. Contingencia de la identificación de metabolitos de Alprazolam por 2 observadores**

		Alprazolam: Observador 2		Total
		Sí	No	
Alprazolam: Observador 1	Sí	14 70,0%	2 10,0%	16 80,0%
	No	0 0,0%	4 20,0%	4 20,0%
Total		14 70,0%	6 30,0%	20 100,0%

Se aprecia que el observador 1 identificó metabolitos de Alprazolam en 16 (80%) muestras de orina, más no en 4 (20%); mientras que el observador 2 logró identificar metabolitos de Alprazolam en 14 (70%) muestras, pero no en 6 (30%). De este modo, la medida de acuerdo obtenida mediante el coeficiente kappa de Cohen establece un valor de 0,737, que equivale a 73,7% de concordancia, el cual es considerado como de buen acuerdo entre las observaciones comparadas. Este resultado, al ser significativo al nivel de p-valor < 0,01, permite validar la nueva técnica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de Alprazolam en muestras de



orina. Por consiguiente, se rechaza la  $H_0$  de la primera hipótesis específica.



**Figura 5. Distribución de las frecuencias de identificación de metabolitos de Alprazolam por los observadores 1 y 2**

**$H_0$ :** La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de diazepam en muestras de orina, no cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

**$H_1$ :** La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de diazepam en muestras de orina, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

**Nivel de significancia:**  $\alpha = 0,01$ .

**Estadística de prueba:** Coeficiente kappa (k) de Cohen = 0,794

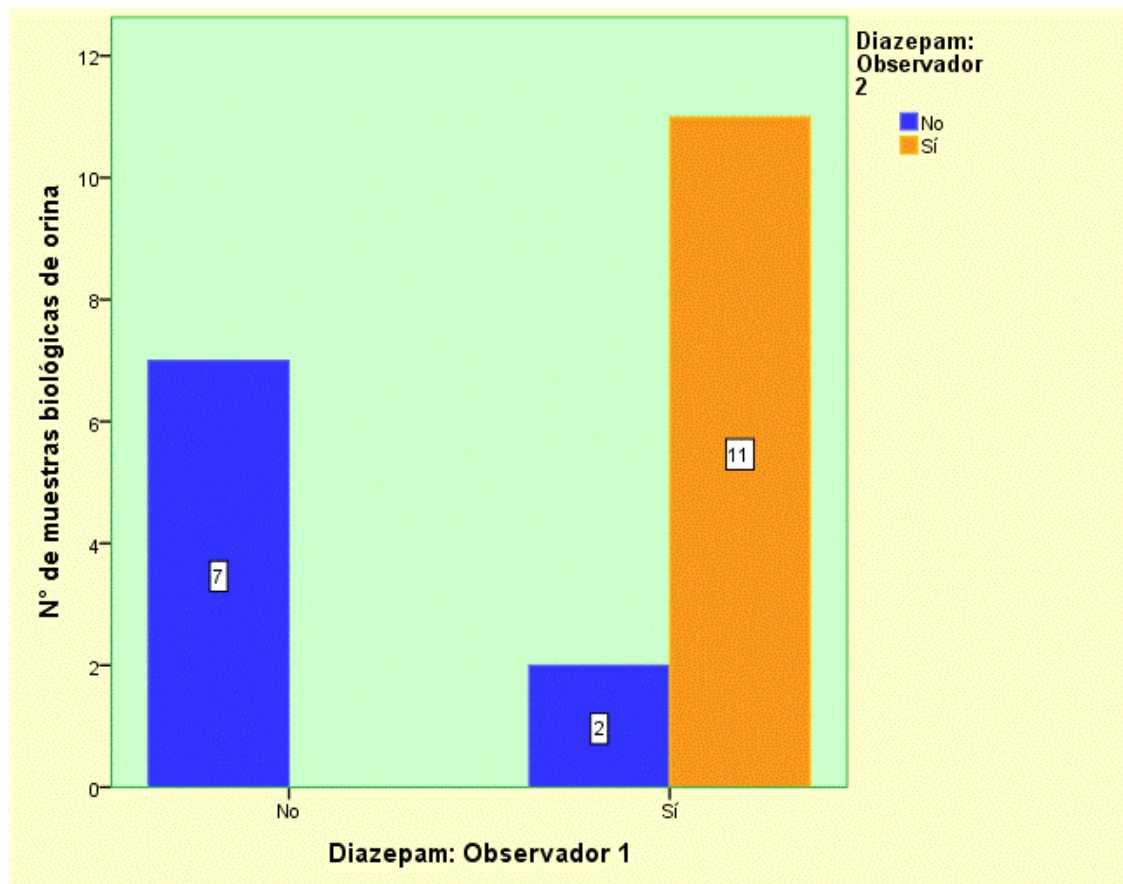
**Estimación del p-valor:** Significación aproximada = 0,000

**Regla de decisión:** Si p-valor < 0,01, entonces k es significativo.  
Como p-valor = 0,000 < 0,01;  
Por tanto, k = 0,794 es significativo y se rechaza H<sub>0</sub>.

**Tabla 11. Contingencia de la identificación de metabolitos de Diazepam por 2 observadores**

		Diazepam: Observador 2		Total
		Sí	No	
Diazepam: Observador 1	Sí	11 55,0%	2 10,0%	13 65,0%
	No	0 0,0%	7 35,0%	7 35,0%
Total		11 55,0%	9 45,0%	20 100,0%

Como se registra en la tabla, el observador 1 identificó metabolitos de Diazepam en 13 (65%) muestras de orina, más no en 7 (35%); mientras que el observador 2 logró identificar metabolitos de Diazepam en 11 (55%) muestras, pero no en 9 (45%). En tal sentido, la medida de acuerdo obtenida mediante el coeficiente kappa de Cohen establece un valor de 0,794, que equivale a 79,4% de concordancia, el cual es considerado como de buen acuerdo entre las observaciones comparadas. Este resultado, al ser significativo al nivel de p-valor < 0,01, permite validar la nueva técnica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de Diazepam en muestras de orina. Por consiguiente, se rechaza la H<sub>0</sub> de la segunda hipótesis específica.



**Figura 6. Distribución de las frecuencias de identificación de metabolitos de Diazepam por los observadores 1 y 2**

**H<sub>0</sub>:** La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de clonazepam en muestras de orina, no cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

**H<sub>1</sub>:** La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de clonazepam en muestras de orina, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

**Nivel de significancia:**  $\alpha = 0,01$ .

**Estadística de prueba:** Coeficiente kappa (k) de Cohen = 0,800

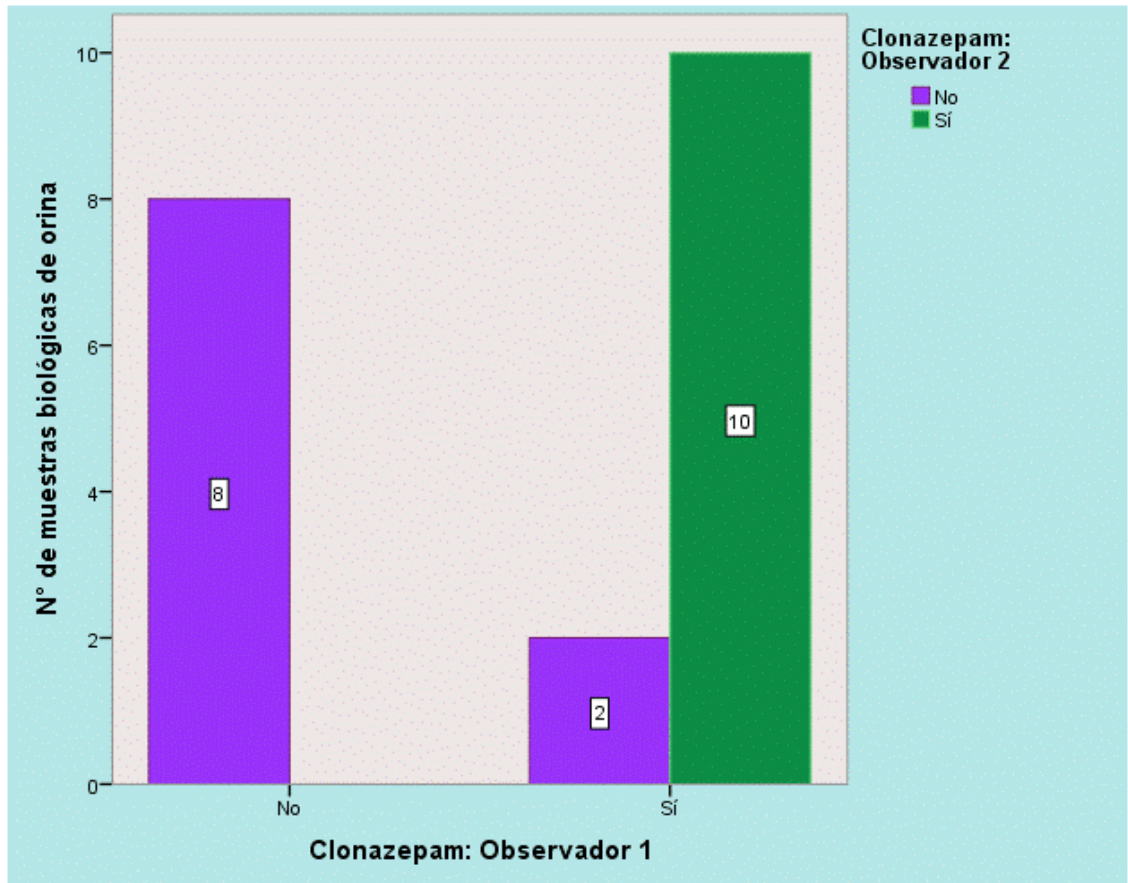
**Estimación del p-valor:** Significación aproximada = 0,001

**Regla de decisión:** Si  $p\text{-valor} < 0,01$ , entonces  $k$  es significativo.  
 Como  $p\text{-valor} = 0,001 < 0,01$ ;  
 Por tanto,  $k = 0,800$  es significativo.

**Tabla 12. Contingencia de la identificación de metabolitos de Clonazepam por 2 observadores**

		Clonazepam: Observador 2		Total
		Sí	No	
Clonazepam: Observador 1	Sí	10 50,0%	2 10,0%	12 60,0%
	No	0 0,0%	8 40,0%	8 40,0%
Total		10 50,0%	10 50,0%	20 100,0%

Como se aprecia en la tabla, el observador 1 identificó metabolitos de clonazepam en 12 (60%) muestras de orina, más no en 8 (40%); mientras que el observador 2 logró identificar metabolitos de Clonazepam en 10 (50%) muestras, pero no en otras 10 (50%). Asimismo, la medida de acuerdo obtenida mediante el coeficiente kappa de Cohen establece un valor de 0,800, que equivale a 80,0% de concordancia, el cual es considerado como de buen acuerdo entre las observaciones comparadas. Este resultado, al ser significativo al nivel de  $p\text{-valor} < 0,01$ , permite validar la nueva técnica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de clonazepam en muestras de orina. Por consiguiente, se rechaza la  $H_0$  de la tercera hipótesis específica.



**Figura 7. Distribución de las frecuencias de identificación de metabolitos de Clonazepam por los observadores 1 y 2**

### 4.3 Discusión de resultados

La bibliografía consultada refiere que la cromatografía en capa fina (CCF) permite identificar sustancias en fluidos, órganos, compuestos empleando una fase móvil y una fase estacionaria. Es una marcha analítica que, mediante el empleo de diferentes reactivos reveladores, identifica sustancias mediante la visualización de manchas. Cuando no se conoce la naturaleza de la intoxicación, envenenamiento o cual es la sustancia a investigar, el screening toxicológico por la CCF identifica y separa grupos químicos, lo que permite una orientación primero y luego una identificación.

A pesar que se refiere como prueba preliminar, al ser comparado con un estándar, previo proceso de extracción, y tener un Rf (factor de retención) definido de acuerdo a la fase móvil empleada, es perfectamente aceptado en los métodos analíticos, prueba de ello es que las dos entidades que emiten dictámenes periciales toxicológicos en el Perú: PNP y MP, emplean estos métodos cuando le son solicitados exámenes químico toxicológicos.

Es importante considerar que se debe tener algunas consideraciones a fin de que la identificación del o los analitos no tenga alguna variabilidad, o sea capaz de ser detectada, ya que en este método influyen mucho los límites de detección. Sin embargo, para la realización de la CCF se debe cumplir con lo siguiente: adecuado proceso u obtención del extracto seco (fase ácida y fase alcalina), secado preferentemente a temperatura ambiente, sembrado adecuado haciéndolo aproximadamente a un cm de la base de la placa, buena preparación de la misma, donde debe ser de forma uniforme y evitar interferencias, el sembrado de los estándares para ser confrontados con los probables analitos presentes en una muestra problema, entre otros.

Durante los ensayos se emplearon diferentes fases móviles, reactivos de identificación, procesos de extracción y pruebas directas que muchas veces no daban resultados esperados a pesar que se recogían información bibliográfica de guías, manuales, tesis desarrolladas, papers, entre otros. Se ensayaron proporciones de fases móviles a pesar de algunas limitaciones, pero se fueron consiguiendo resultados alentadores.

Se emplearon diversas fases móviles como Ciclo hexano: tolueno: di etilamina (75:15:10); Cloroformo: metanol (90:10); Acetato de etilo y cloroformo (1:1); metanol: acetona: trietanolamina (1:1:0,01); cloroformo: acetona (4:1); metanol: acetona (1:1); metanol: amoniaco (100:1.5); N-

propanol: acetona (1:1); Acetato de etilo: metanol: amoniaco al 25% (85:10.5); cloroformo, acetona: (9:1); cloruro de metileno, acetona y etanol (4:4:2), benceno, etanol (4:1) entre otros.

El objetivo en un primer momento era validar una técnica analítica que permita identificar benzodiazepinas mediante la cromatografía en capa fina (CCF), para ello era necesario buscar una especificidad, lo cual indicaría que un determinado reactivo sea específico para la identificación de una sustancia (benzodiazepina).

Luego de diversos ensayos se determinó que no había especificidad para identificar benzodiazepinas (alprazolam, clonazepam y diazepam), al comprobar la no existencia de reactivo específico. Luego de ello se planteó otro objetivo, el cual consistía en buscar una técnica selectiva de identificación de benzodiazepinas.

Los ensayos indican que, al emplear diversas fases móviles y reactivos reveladores, no se encontró especificidad, pero si se pudo establecer reactivos que mostraban mayor selectividad al momento de revelar las placas cromatográficas. Se indica a los reactivos de Dragendorff, Iodoplatinato, Markis, Tiocianato, apoyados con otros reactivos como Ácido Clorhídrico, formaldehído que permitía intensificar los colores que se mostraban en las placas cromatográficas. También se debieron calentar las placas para favorecer la reacción química.

A pesar de que la visualización de manchas que aparecen al emplear reactivos en la aspersion permite comparar una mancha con otra, se debe considerar que no siempre se tratan de estándares frente a sustancias puras, sino que también se tienen metabolitos productos del proceso de biotransformación que suceden en el organismo al ingerir una sustancia.

La aparición de manchas, se ve apoyada en la obtención de los Rf de cada sustancia, que varían de forma mínima, pero mantienen un promedio, lo que va de acuerdo a las diferentes fases móviles que se emplean en el examen químico toxicológico.

La altura de migración es particular para cada sustancia, lo cual indica, que, si dos manchas se encuentran a alturas diferentes, ello indica que son sustancias diferentes, de otro lado cuando las sustancias tienen la misma altura de recorrido y la misma coloración, reaccionando al mismo reactivo, se tratan de sustancias iguales, los cuales se pueden confirmar con otros reactivos, o llevados también a un equipo como el espectrómetro de masas.



## **CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1 CONCLUSIONES**

Se logró validar una técnica analítica para identificar benzodiazepinas alprazolam, diazepam y clonazepam, por el método de cromatografía en capa delgada.

Se identificaron diferentes fases móviles y reactivos reveladores principales como Dragendorff, Iodoplatinato, Markis, Tiocianato, que identifican benzodiazepinas (alprazolam, clonazepam y diazepam) mostrando una alta selectividad el Dragendorff, Iodoplatinato por el método de cromatografía en capa fina.

### **5.2 RECOMENDACIONES**

Realizar ensayos analíticos diversos para identificación de drogas, tóxicos y venenos involucrados en hechos delictivos.

Validar diversas técnicas para identificación de sustancias químicas como tóxicos, drogas o venenos por el método de cromatografía en capa fina.

Implementar en las universidades públicas o privadas y en su facultad de Farmacia y Bioquímica, laboratorios de toxicología que sirva como soporte científico a la comunidad en las diferentes áreas de toxicología principalmente en el área clínico forense.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Ayuso J, ¿Está justificado el tratamiento prolongado con benzodicepinas? Salud Mant. 2008 Dic [citado 2017 Ago. 30] 31(6): 429-430. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33252008000600001&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33252008000600001&lng=es).
- 2.- Gil Ana, Nuevos métodos de determinación de benzodicepinas en muestras biológicas de interés. Madrid: Universidad Nacional de Educación a distancia [tesis doctoral en Internet]. 2016 [citado 2017 Ago. 30] 222p. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/cittes?codigo=65800>
- 3.- Gámez Lechuga M, Irala Indart C. Selección de benzodicepinas bases para su utilización en el hospital. Farm Hosp [revista en la Internet] 1996; 21 (2): 117-122. Disponible en: <http://docplayer.es/12166613-Seleccion-de-benzodiazepinas-bases-para-su-utilizacion-en-el-hospital.html>
- 4.- Fonseca Tapia Galo Daniel, Determinación de benzodicepinas en orina, por cromatografía en capa fina. Provincia de Chimborazo al laboratorio de Química Forense del departamento de Criminalística de la policía judicial de Chimborazo. Junio-noviembre del 2012. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo [tesis doctoral en Internet]. 2016 [citado 2017 Ago. 30] 222p. <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/1186>
- 5.- Román Marquina H. "Identificación de benzodicepinas en situaciones delictivas investigadas por la dirección territorial de policía (DIRTEPOL) la libertad, enero 2012 – diciembre 2013". [Tesis de grado en Internet]. La Libertad: Universidad Nacional de Trujillo; 2015 [citada 20 Julio 2017]. 39 p. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1364>
- 6.- Retuerto M, "Determinación química de cocaína, marihuana y otros psicofármacos en escolares de 4to y 5to año de educación Secundaria en 4 colegios estatales del distrito de Breña". ". [Tesis de grado en Internet]. Lima

1999.

[http://directorio.concytec.gob.pe/appDirectorioCTI/VerDatosInvestigador.do;jsessionid=fe1d99c2802eb559f40a31448e71?id\\_investigador=13417](http://directorio.concytec.gob.pe/appDirectorioCTI/VerDatosInvestigador.do;jsessionid=fe1d99c2802eb559f40a31448e71?id_investigador=13417)

7.- Valenzuela Morales G. Propuesta de una metodología para detección de drogas de abuso en muestras de orina, en el laboratorio de análisis clínicos del centro de investigación en ciencias médicas (cicmed). [Tesis de grado en internet]. México: Facultad de química, Universidad del Estado de México; 2013 [citada 20 Julio 2017]. 70 p. <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/14378/407977.pdf?sequence=1>

8.- Linares Rebollo M. Identificación de metabolitos de benzodiazepinas en orina mediante las técnicas de inmunoensayo y gc /ms [Tesis de grado en internet]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013 [citada 20 julio 2017]. 104p. Disponible en: [http://condor.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis\\_linares\\_rebollo.pdf](http://condor.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_linares_rebollo.pdf)

9.- Flores Fuentealba Daniela Mariana. Validación de una metodología analítica para la determinación de Diazepam y Nordiazepam en sangre, por cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones, previa extracción en fase sólida, en la unidad de toxicología en el Servicio Médico Legal de Temuco. [Tesis de grado en internet]. Chile: Facultad de química, Universidad Austral de Chile; 2013 [citada 20 Julio 2017]. 70 p. Disponible en: [cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fcf364v/doc/fcf364v.pdf](http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fcf364v/doc/fcf364v.pdf)

10.- Flores Fuentealba D. "Validación de una metodología analítica para la determinación de diazepam y Nordiazepam en sangre, por cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones, previa extracción en fase sólida, en la unidad de toxicología del servicio médico legal de Temuco." [Tesis Pregrado]. Valdivia: Servicio Médico Legal, Universidad Austral de Chile; 2013. [cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fcf364v/doc/fcf364v.pdf](http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fcf364v/doc/fcf364v.pdf)

11.- Manual de anestesiología [internet]. San Juan de Dios Anestesia [citado el 28 de noviembre 2017]. Disponible en:

<http://manualdeanestesiologia.blogspot.pe/2010/09/mecanismos-de-accion-de-las.html>

12.- Ministerio de Salud de Costa Rica, Diazepam [Folleto Informativo]. Costa Rica; 2013 [citada 28 agosto 2017]. Disponible en: [https://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/bioequivalencia/protocolos\\_psicotropicos\\_estupefacientes/protocolo/protocolo\\_diazepam.pdf](https://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/bioequivalencia/protocolos_psicotropicos_estupefacientes/protocolo/protocolo_diazepam.pdf)

13.- Ontiveros Sánchez de la Barquera José Alfonso. Estudio controlado doble-ciego con clonazepam y placebo en pacientes con trastorno de ansiedad social. Salud Ment [revista en la Internet]. 2008 Ago. [Citado 2017 Ago. 31]; 31(4): 299-306. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33252008000400007&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33252008000400007&lng=es).

14.- Bovina, E., De Philippi's, P., Cavrini, V., Ballardini, R. en Albin, A., Fasani, E., (Eds.), Drugs: Photochemistry and Photostability, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, pp. 306 disponible en: [http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n3313\\_GallardoCabrera.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n3313_GallardoCabrera.pdf)

15.- H Allen, J.M., Allcn S.K., Ling B., en Albin, A., Fasani, E., (Eds.), Drugs: Photochemistry and Photostability, Royal Society of Chcmistry, Cambridge, 1998, pp. 174 Disponible en [http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n3313\\_GallardoCabrera.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n3313_GallardoCabrera.pdf)

16.- Moro MA, Lizasoain I. Benzodiacepinas, Barbitúricos y otros Hipnóticos. Drogodependencias. Farmacología, Patología, Psicología, Legislación. 2ª ed. España. Editorial Médica Panamericana. 2003:425-331.

17.- Mondragón M, Etxebarria A, Madrazo A. Agonistas y antagonistas del receptor de benzodiacepinas. Tratado de psicofarmacología, bases y aplicación clínica. España. Editorial Médica Panamericana. 2005:306-316.

- 18.- The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.1998. Hannover. Eurachem (Folleto)
19. - ISO GUIDE 88402. ISO, International Organization for Standardization: Quality Vocabulary, Ginebra, 1994
- 20.- UPS 28 –NF 23; BRITISH PHARMACOPOEIA 2002 (BP 2002); Ph. Eur.3; Metodo General (MG)
21. - The Office Publication of the European community information service, 1990. The Rules of Governing Medicinal Products in the European Community. Washington D.C. volume 3A. pp. 1-16.
- 22.- Rampaso P. Standardization and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry. Imola. Farma. 1990. pp. 807-815
23. - MURILLO, J. LEMUS, J. GARCÍA, L. 1991. Simultaneous determination of 7-ACA and 7-ADCA by second derivative spectrophotometry. Anal Lett. pp. 683-699.
- 24.- NORMA CUBANA NC: 26-212. 1992. Evaluación de características y validación de métodos de ensayo. Buenas prácticas de laboratorio. Comité Estatal de Normalización. La Habana: Ministerio de Salud Pública. (Folleto).
25. - MARTIN-SMITH M, RUDD DR. 1990. The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals. Acta Pharm Jugosl. pp. 7-19
26. - TORRES, A. CAMACHO, M. 1992. Validation of two analytical methods applied to two new cytostatic drugs. 2Ed. Bonn.STP Pharma. pp. 93-99
- 27.- GUÍA PARA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO 26-09-2003. Colorado. www.eurachem.org 02-12-2010

28.- Farmacopea europea 1991. Pp.1241-1255.  
depa.pquim.uman.mx/fercor/dqo/manuales/1311/p7.pdf.

29.- Universidad autónoma de México [internet]. México. Facultad de química. Técnicas cromatografías diciembre 2007.p 3[citado 26 agosto 2017].  
[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)

30.- Cromatografía en capa fina [internet] [citado el 30 dediciembre2017]  
disponible en:

<https://www.uam.es/docencia/jppid/documentos/practicasyactuales/guion-p6.pdf>

31. - Coverley Clarke E. Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Post-mortem Material .2 ed. Pharmaceutical Press. Universidad de Michigan; 2008

32.- Herrera Carlos, et al, Química de alimentos, Manual de laboratorio, Ed Universidad de Costa Rica, 1ra Ed, 2003

33.- Aura Palencia, Gabriela Romero, Ewwa Dubaj de Danielle. Las muestras en toxicología forense. Importancia de la cadena de custodia. Salus Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo 2008; 12: 52-56

34.- Protocolo modelo para la investigación forense de muertes sospechosas de haberse producido por violación de los derechos humanos. Oficina del Alto Comisionado para los Derechos Humanos de las Naciones Unidas proyecto MEX/00/AH/10. (2001).

35.- Villanueva Cañadas. Gilbert Calabuig, Medicina Legal y Toxicología. 6ª ed., Masson, Barcelona, 2004 Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. 5ª ed., MacGraw Hill, New York, 1996 Disponible en: <http://www.ugr.es/~fgil/proyecto/fraccionamiento/fundamento.html>

36.- "Análisis Toxicológico Orgánico". Menéndez M y col. En Ampliación de Postgrado en Toxicología -17. M. Repetto (ed.). CD-ROM. Ilustre Colegio Oficial de Químicos. Sevilla, 2007. © ISBN: 13: 978-84-695-3142-6. Depósito Legal: SE-182-07. Disponible: <https://es.scribd.com/doc/39621840/analisis-toxicologic>

37.- Alfredo Fernández Serret, Yeni Aguilera Cabrera, Iván Morales Lacarrere y Esther Alonso Jiménez. Validación de los métodos analíticos para la identificación y cuantificación del dextrometorfano jarabe. Rev. Cubana Farm [internet]. 2002; 36(1):28-34.

38. Alvarez Elena, Determinación de drogas de abuso empleadas en sumisión química mediante cromatografía líquida capilar, Departamento de Química Analítica, Universidad de Granada; 2016

39.- Universidad central de Venezuela. Guía de cromatografía [Guía en internet]. Caracas: Facultad de ciencias instrumental analítico; 2008.

40.- Universidad nacional autónoma de México (UNAM). Manual de prácticas para el laboratorio de química orgánica I. [Manual en internet]. México: Facultad de química, Departamento de química orgánica; 2016.  
[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Manual2016-1\\_31098.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Manual2016-1_31098.pdf)

41. Goodman & Gilman. Las Bases farmacológicas de la terapéutica. 12a ed. Colombia: McGRAW-HILL INTERAMERICANA. 2012

42. Flórez, J.: Farmacología Humana. 4<sup>o</sup> ed. España: Masson, S.A.: 2001

43. Hurlé MA, Monti J, Flóres J. Fármacos ansiolíticos y sedantes. Farmacología de los trastornos del sueño. Farmacología Humana. 5<sup>a</sup> ed. España. Elsevier Masson. 2008:543-566

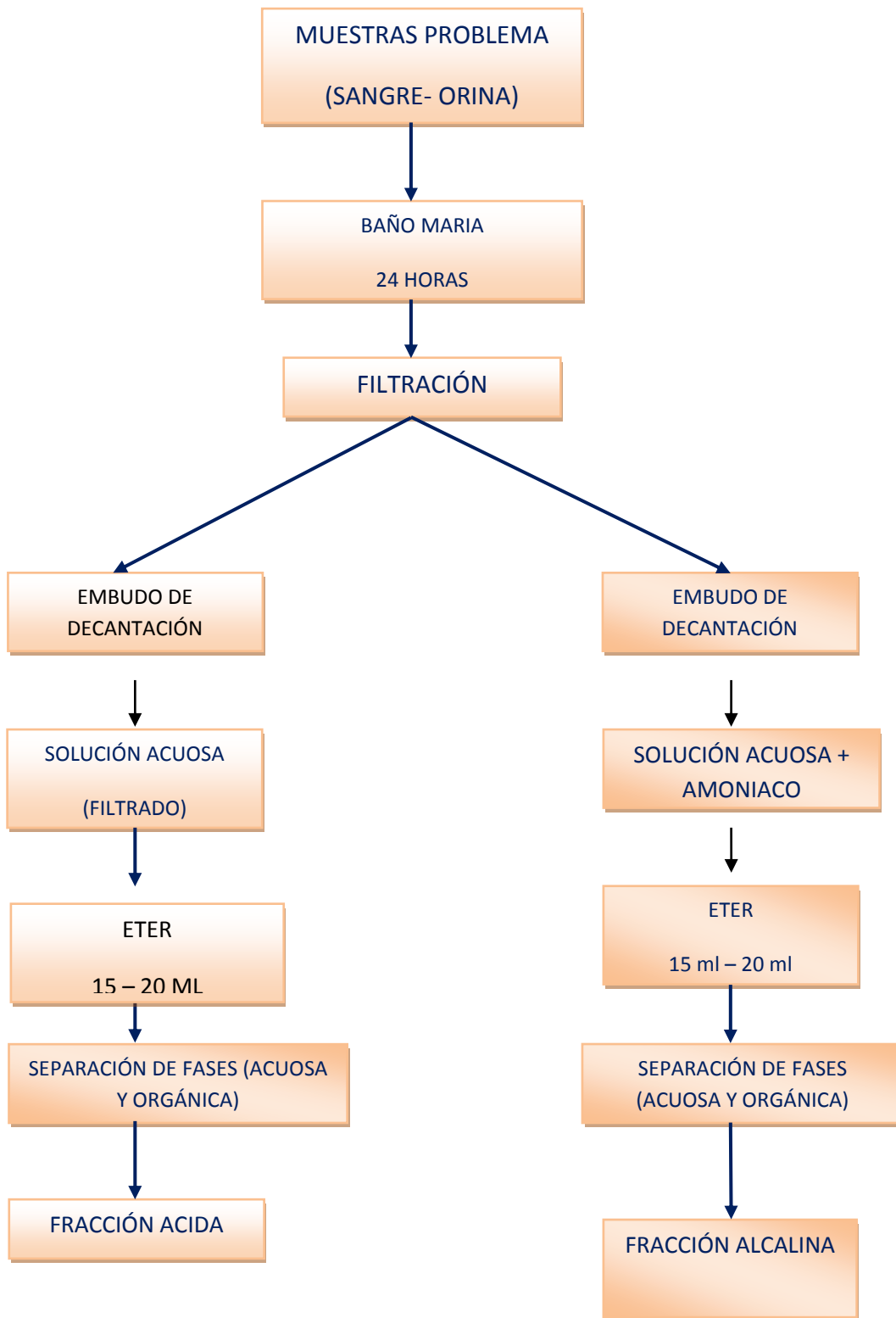
## Anexo 1. Matriz de consistencia

### VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA POR CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA PARA IDENTIFICAR METABOLITOS DE ALPRAZOLAM, DIAZEPAM Y CLONAZEPAM EN MUESTRAS DE ORINA EN PACIENTES ADULTOS DEL HOSPITAL DOS DE MAYO EN EL AÑO 2017”.

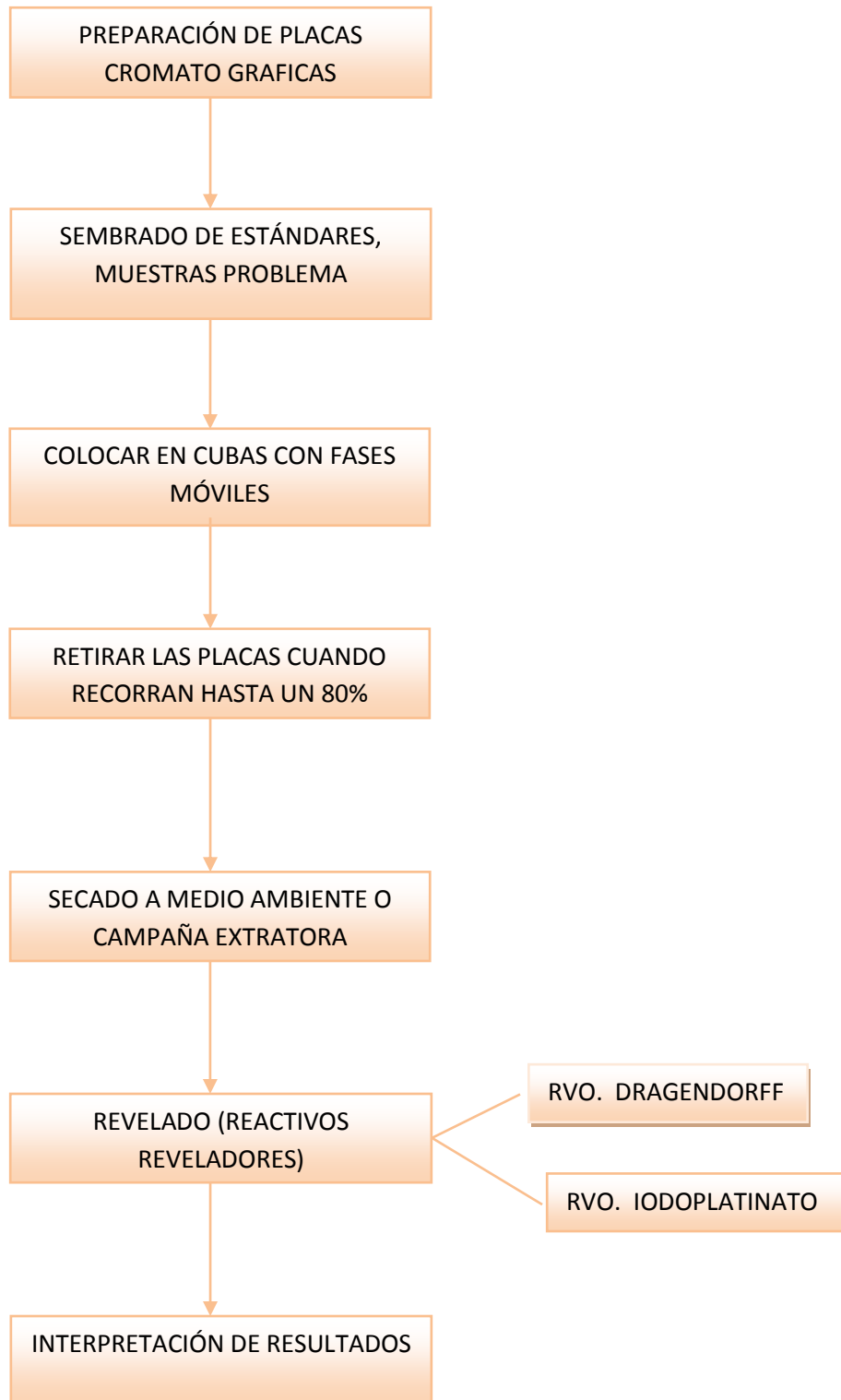
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLE	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADORES
<p><b>Problema general</b></p> <p>¿Se puede validar una técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de alprazolam, diazepam y clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017?</p>	<p><b>Objetivo General</b></p> <p>Validar una técnica analítica por cromatografía de capa fina para identificar metabolitos de alprazolam, diazepam, clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017.</p>	<p><b>Hipótesis General</b></p> <p>La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de alprazolam, diazepam y clonazepam en muestras de orina, cumple con los parámetros de desempeño de la validación</p>	<p><b>Variable Independiente</b></p> <p>Validación de la técnica analítica en cromatografía en capa fina</p>	<p>La identificación de benzodicepinas se realiza por un método analítico (CCF), el cual será validado por juicio de expertos</p>	<p>Técnica analítica por CCF</p> <p>Presencia o ausencia de benzodicepinas</p>	<p>Identificación de benzodicepinas</p> <p>Identificación de benzodicepinas</p>
<p><b>Problema específico</b></p> <p>¿De qué forma la validación de la técnica analítica por cromatografía en capa fina permite identificar metabolitos de alprazolam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017?</p> <p>¿De qué forma la validación de la técnica analítica por cromatografía en capa fina permite identificar metabolitos de diazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017?</p> <p>¿De qué forma la validación de la técnica analítica por cromatografía en capa fina permite identificar metabolitos de clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017?</p>	<p><b>Objetivo específico</b></p> <p>Validar la técnica analítica por cromatografía de capa fina para identificar metabolitos de alprazolam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017.</p> <p>Validar la técnica analítica por cromatografía de capa fina para identificar metabolitos de diazepam, en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017.</p> <p>Validar la técnica analítica por cromatografía de capa fina para identificar metabolitos de clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo en el año 2017.</p>	<p><b>Hipótesis Específica</b></p> <p>La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de alprazolam en muestras de orina, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.</p> <p>La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de diazepam en muestras de orina, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.</p> <p>La nueva técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de clonazepam en muestras de orina, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.</p> <p>El uso correcto de los instrumentos calificados y calibrados permiten la validación de la técnica analítica por cromatografía en capa fina para identificar metabolitos de flunitrazepam, diazepam y clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del Hospital Dos de Mayo año 2017.</p>	<p><b>Variable dependiente</b></p> <p>Identificación de las benzodicepinas alprazolam, diazepam y clonazepam.</p>			<p>Validación por juicio de expertos</p>



## Anexo 2. Fluxograma del análisis químico toxicológico –fase1



### Anexo 3. Fluxograma del análisis químico toxicológico –fase2



#### Anexo 4. Separación de fases orgánica y acuosa



Filtración de las muestras problemas (orina) de personas que se han administrado benzodiazepinas.

#### Anexo 5. Proceso de filtración



Separación de la fase acuosa y la fase orgánica.

## Anexo 6. Tornasol para medir acidez o alcalinidad – pH -



Tornasol que determina el grado de acidez o alcalinidad de la sustancia a investigar (muestra problema)

## Anexo 7. Preparación y activación de placas



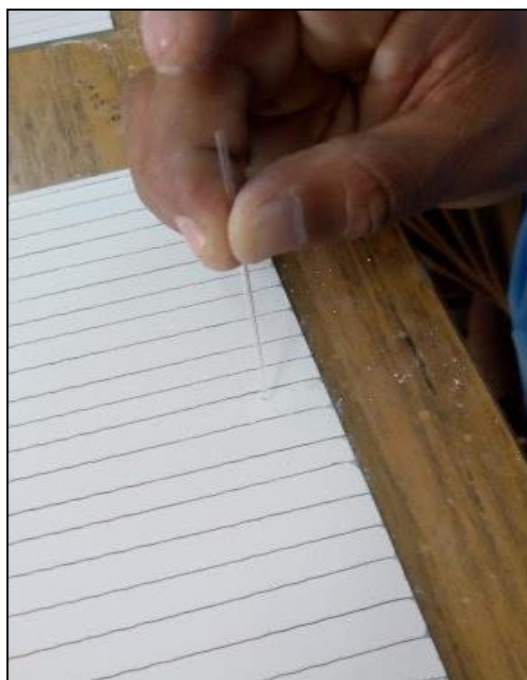
Secado y activación de la placa cromatográfica.

### Anexo 8. Extracto seco 1° fase



Frascos viales donde se realizó la extracción a partir de la solución acuosa.

### Anexo 9. Sembrado de muestras problemas (benzodiazepinas) en placas cromatográficas



## Anexo 10. Placas cromatográficas en fase móvil



## Anexo 11. Reactivos reveladores empleados en identificación de benzodiazepinas



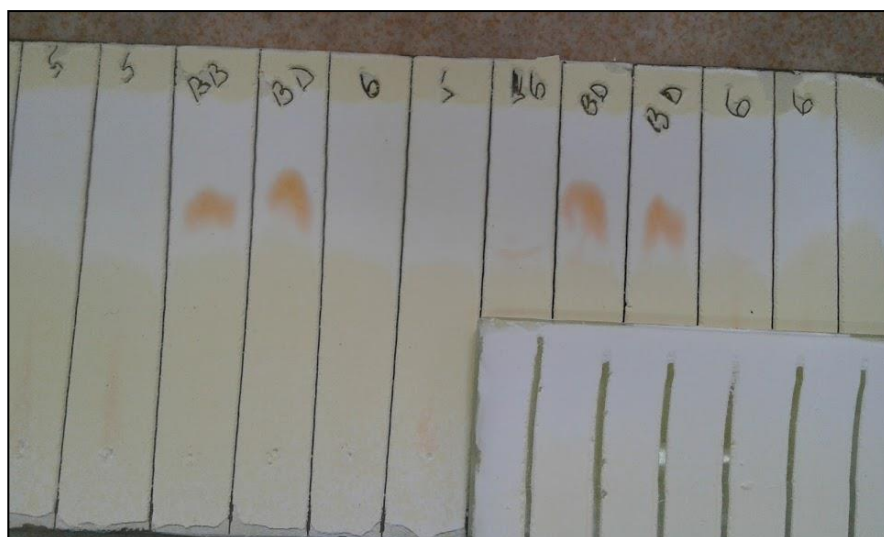


**Anexo 12. Ensayos de identificación de tipos de benzodiazepinas (diazepam, clonazepam, alprazolam, clordiazepóxido)**



Fuente: Identificación de benzodiazepinas en ensayos analíticos empleando la fase móvil metanol: acetona: trietanolamina (1:1:0.01)

**Anexo 13. Ensayos de identificación de benzodiazepinas como grupo farmacológico**



## Anexo 14. Juicio de experto, validación N# 1

- I. DATOS GENERALES: MANUEL HERNANDEZ AGUILAR  
 TITULO: QUIMICO FARMACEUTICO CQFP 06875  
 AREA DE TRABAJO: LABORATORIO DE TOXICOLOGIA Y QUIMICA LEGAL - INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES  
 OTRA LABOR: DOCENTE UNIVERSITARIO  
 EXPERIENCIA COMO PROFESIONAL: 27 AÑOS  
 EXPERIENCIA COMO PERITO TOXICÓLOGO FORENSE: 10 AÑOS  
 CARGO: QUIMICO FARMACEUTICO ANALISTA

Considerar los procedimientos y realización de los análisis en la identificación de benzodiazepinas, siguiendo protocolos, manuales, guías, experticia. Evaluar según criterios establecidos de 1 a 5 puntos de acuerdo con:

(1) Malo	(2) Regular	(3) Aceptable	(5) Muy bueno	(5) Excelente
----------	-------------	---------------	---------------	---------------

INDICACIONES	CRITERIOS DE EVALUACION	PUNTUACION				
		1	2	3	4	5
Claridad	Los protocolos y guías estan bien formulados					X
Objetividad	Razonamiento e imparcialidad					X
Actualidad	Los instrumentos se adecuan a criterios científicos y tecnológicos					X
Organización	Los procedimientos tienen orden lógico					x
Suficiente	Son suficientes los protocolos					x
Intencionalidad	Es adecuado el método analítico a emplear					x
Consistencia	Está basado en fuentes científicas de la farmacología y toxicología					x
Coherencia	Relación entre protocolos, procedimientos e hipótesis					x
Metodología	La estrategia responde al objetivo de la problemática de la investigación.					x
Pertinencia	Existe relación entre investigación y método científico,					x
	<b>TOTAL</b>					50

II. OPINION: APROBADO Y APLICABLE

III. PUNTAJE: 50 PUNTOS

MANUEL HERNANDEZ AGUILAR  
 MANUEL G. HERNANDEZ AGUILAR  
 QUIMICO FARMACEUTICO  
 C.Q.F.P. 06875  
 DNI: 21447565



## Anexo 15. Juicio de experto, validación N#2

II. DATOS GENERALES: EDGARD LUIS COSTILLA GARCIA  
 TITULO: QUIMICO FARMACEUTICO CQFP 11394  
 LABORO EN LABORATORIO DE TOXICOLOGIA Y QUIMICA LEGAL - INSTITUTO DE  
 MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES  
 AREA DE TRABAJO: DOCENTE UNIVERSITARIO  
 EXPERIENCIA COMO PROFESIONAL: 12 AÑOS  
 EXPERIENCIA COMO PERITO TOXICÓLOGO FORENSE: 08 AÑOS  
 CARGO: QUIMICO FARMACEUTICO ANALISTA

Considerar los procedimientos y realización de los análisis en la identificación de benzodiazepinas, siguiendo protocolos, manuales, guías, experticia. Evaluar según criterios establecidos de 1 a 5 puntos de acuerdo a:

(1) Malo	(2) Regular	(3) Aceptable	(5) Muy bueno	(5) Excelente
----------	-------------	---------------	---------------	---------------

INDICACIONES	CRITERIOS DE EVALUACION	PUNTUACION				
		1	2	3	4	5
Claridad	Los protocolos y guías estan bien formulados					X
Objetividad	Razonamiento e imparcialidad					X
Actualidad	Los instrumentos se adecuan a criterios científicos y tecnológicos					X
Organización	Los procedimientos tienen orden lógico					x
Suficiente	Son suficientes los protocolos					x
Intencionalidad	Es adecuado el método analítico a emplear					x
Consistencia	Está basado en fuentes científicas de la farmacología y toxicología					x
Coherencia	Relación entre protocolos, procedimientos e hipótesis					x
Metodología	La estrategia responde al objetivo de la problemática de la investigación.					x
Pertinencia	Existe relación entre investigación y método científico,					x
	<b>TOTAL</b>					50

II. OPINION: APROBADO Y APLICABLE

III. PUNTAJE: 50 PUNTOS

  
 .....  
 EDGARD LUIS COSTILLA GARCIA

## Anexo 16. Juicio de expertos, validación N#3

I. DATOS GENERALES: WALTER RIVERA ALZE  
 TITULO: QUIMICO FARMACEUTICO  
 AREA DE TRABAJO: LABORATORIO DE TOXICOLOGIA Y QUIMICA LEGAL - INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES – MINISTERIO PUBLICO  
 OTRA LABOR: DOCENTE UNIVERSITARIO  
 EXPERIENCIA COMO PROFESIONAL: 10 AÑOS  
 EXPERIENCIA COMO PERITO TOXICÓLOGO FORENSE: 02 AÑOS  
 CARGO: QUIMICO FARMACEUTICO ANALISTA

Considerar los procedimientos y realización de los análisis en la identificación de benzodiazepinas, siguiendo protocolos, manuales, guías, experticia. Evaluar según criterios establecidos de 1 a 5 puntos de acuerdo con:

(1) Malo	(2) Regular	(3) Aceptable	(5) Muy bueno	(5) Excelente
----------	-------------	---------------	---------------	---------------

INDICACIONES	CRITERIOS DE EVALUACION	PUNTUACION				
		1	2	3	4	5
Claridad	Los protocolos y guías estan bien formulados					X
Objetividad	Razonamiento e imparcialidad					X
Actualidad	Los instrumentos se adecuan a criterios científicos y tecnológicos					X
Organización	Los procedimientos tienen orden lógico					x
Suficiente	Son suficientes los protocolos					x
Intencionalidad	Es adecuado el método analítico a emplear					x
Consistencia	Está basado en fuentes científicas de la farmacología y toxicología					x
Coherencia	Relación entre protocolos, procedimientos e hipótesis					x
Metodología	La estrategia responde al objetivo de la problemática de la investigación.					x
Pertinencia	Existe relación entre investigación y método científico,					x
	<b>TOTAL</b>					50

II. OPINION: APROBADO Y APLICABLE

III. PUNTAJE: 50 PUNTOS

  
 WALTER RIVAS ALZE

Walter Rivas Altez  
 Químico Farmacéutico  
 C.Q.F.P. 13864  
 DNI: 09238422

## Anexo 17. Flujograma de actividades

“VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PARA IDENTIFICAR METABOLITOS DE ALPRAZOLAM, DIAZEPAM Y CLONAZEPAM EN MUESTRAS DE ORINA EN PACIENTES ADULTOS DEL HOSPITAL DOS DE MAYO EN EL AÑO 2017”.

