



**Universidad
Zaragoza**

Trabajo Fin de Grado

**Los métodos de screening en Química Analítica.
Aplicaciones en el ámbito forense**

**Screening methods in Analytical Chemistry.
Forensic applications**

Autor

María García Lasala

Director

José María Mir Marín

FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento Química Analítica
Convocatoria de Septiembre
Curso 2018/2019

ÍNDICE

2) OBJETIVOS	3
3) INTRODUCCIÓN.....	4
4) MÉTODOS DE SCREENING.....	5
4.1) DEFINICIÓN	5
4.2) CLASIFICACIÓN	5
5) POSIBILIDADES ANALÍTICAS DE LOS MÉTODOS DE SCREENING	8
5.1) METODOLOGÍA Y TÉCNICAS	8
5.2) CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA Y CALIDAD DE LOS MÉTODOS.....	13
5.2.1) PROPIEDADES ANALÍTICAS.....	13
5.2.2) VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN.....	17
6) APLICACIONES.....	18
6.1) ÁMBITO FORENSE.....	19
7) CONCLUSIONES.....	24
8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

1) RESUMEN

En los últimos años, las necesidades con respecto a la información analítica requerida por partes de diferentes entidades o particulares han ido evolucionando, de modo que, en la actualidad, se busca aportar al cliente, exclusivamente, la información que necesita en un período corto de tiempo y que esto suponga bajos costes a nivel económico. Por esta razón, la Química Analítica también ha evolucionado para cubrir estas nuevas necesidades y, para ello, se han desarrollado los métodos de screening. Estos métodos destacan por ser sencillos, rápidos y baratos, pudiéndose aplicar en diversos ámbitos, tales como medicina, medioambiente, industria alimentaria y farmacéutica, entre otros. Una de las aplicaciones que está en auge es el ámbito forense ya que precisa de métodos rápidos y eficaces que puedan ayudar en la resolución de cuestiones de índole jurídico en lo que respecta a la parte de investigación y análisis químico del proceso. Por ejemplo, son muy utilizados para la detección de fluidos biológicos como sangre y semen en diferentes tipos de delitos como pueden ser violaciones sexuales, agresiones, etc. También tiene gran relevancia en la protección de la seguridad vial permitiendo el control del consumo de alcohol y drogas en los conductores, o en la detección de otras sustancias peligrosas como son los explosivos con el fin de proteger a los ciudadanos contra posibles ataques terroristas. Por todo esto, es conveniente el continuo estudio y desarrollo de estos métodos para mejorar las posibilidades analíticas que proporcionan.

ABSTRACT

In recent years, the needs with regard to the analytical information required by parts of different entities or individuals have evolved, so that, at present, it is sought to provide to the client, exclusively, the information they need in a short period of time and that this implies low costs at an economic level. For this reason, Analytical Chemistry has also evolved to meet these new needs and, to this aim, screening methods have been developed. These methods stand out for being simple, fast and inexpensive, and can be applied in various fields, such as medicine, environment, food and pharmaceutical industry, among others. One of the applications that is on the rise is the field of forensics as it requires rapid and effective methods that can assist in the resolution of legal issues with regard to the research and chemical analysis part of the process. For example, they are widely used for the detection of biological fluids such as blood and semen in different types of crimes such as rape, aggression, etc. They also have great relevance in the protection of road safety allowing the control of alcohol and drug use in drivers, or in the detection of other dangerous substances such as explosives in order to protect citizens from possible terrorist attacks. For all these reasons, it is advisable to continuously study and develop these methods in order to improve the analytical possibilities they provide.

2) OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado de tipo 4 es la realización de una memoria bibliográfica original y crítica basada en los métodos de screening y en su aplicación en los diferentes campos analíticos, centrándose fundamentalmente en el ámbito forense. A partir de este objetivo principal se derivan otros objetivos más específicos que se enumeran a continuación:

1. Realizar búsquedas bibliográficas en fuentes contrastadas de conocimientos en Química Analítica acerca del tema principal del trabajo, es decir, los métodos de screening.
2. Dar a conocer la tendencia de la Química Analítica hasta la actualidad, contextualizando los métodos de screening.
3. Presentar las aplicaciones de los métodos de screening en los campos más relevantes.
4. Desarrollar las principales aplicaciones de los métodos de screening en el ámbito forense, concretamente, en el análisis de alcohol, drogas, sangre, semen y explosivos.
5. Poner de manifiesto los conocimientos adquiridos a lo largo del grado.

3) INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la demanda de información con respecto a las determinaciones químicas por parte de los clientes, como pueden ser entidades públicas o privadas, particulares o incluso la propia legislación, ha evolucionado drásticamente ^{1,2} por lo que el enfoque de la Química Analítica también lo ha hecho. Esta evolución se plasma fundamentalmente en la manera de describir esta disciplina, pudiendo ser una definición completa la siguiente: *"La química analítica es una disciplina metrológica que desarrolla, optimiza y aplica procesos de medición destinados a producir información (bio)química de calidad de tipo global y parcial a partir de objetos y sistemas naturales y artificiales para resolver problemas analíticos derivados de las necesidades de información."* ³ Por tanto, la Química Analítica tiene dos objetivos principales, unos mayorizantes, que consisten en obtener la máxima información con la máxima calidad metrológica posible, y otros minorizantes, que se basan en obtener esa información de calidad utilizando la menor cantidad factible de tiempo, costes, material, recursos humanos y riesgos para el medioambiente. Ambos objetivos son contradictorios entre sí por lo que es necesario adoptar un compromiso de calidad entre ellos, es decir, aportar, exclusivamente, la calidad suficiente y necesaria demandada por el cliente rebajando así los objetivos minorizantes nombrados anteriormente. ⁴

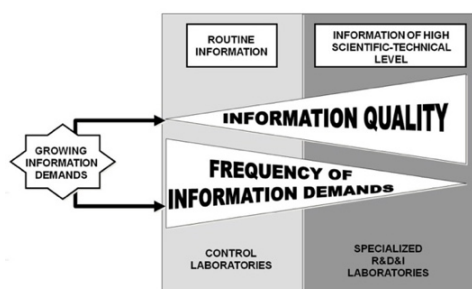


Figura 1. Muestra la contradicción existente entre la frecuencia de la información demandada y la calidad de esa información. En laboratorios de control, la frecuencia de información demandada es muy alta ya que se trata de información rutinaria por lo que se sacrifica la calidad de esa información. En cambio, en laboratorios de I+D+I (Investigación + Desarrollo + Innovación) se requiere una cantidad de información menor, pero con una calidad muy alta. ³

Esta nueva tendencia que está adoptando la Química Analítica durante estas últimas décadas, conduce al desarrollo de nuevos métodos analíticos capaces de cubrir las necesidades actuales, es decir, la obtención de la información necesaria, de forma rápida y fiable, para solventar los problemas analíticos que el cliente plantea.⁵ Por tanto, se trata de ofrecer al cliente la información simplificada que realmente necesita para solventar su problema, sin aportar ningún exceso de información que no sea útil para ese propósito.⁶ Para ello, se han desarrollado los métodos analíticos de respuesta rápida los cuales aportan información tanto de tipo cualitativo como de tipo cuantitativo.⁷ La información cualitativa proporciona una clasificación con respecto a una referencia establecida, en cambio, la información cuantitativa facilita números que reflejan cantidades absolutas, en este caso, de analito existente en una muestra.⁸ Algunos ejemplos de métodos de respuesta rápida son los sensores químicos o bioquímicos que transforman una determinada actividad en una señal, la introducción directa de muestras sólidas en determinados instrumentos, es decir, sin previo tratamiento de las muestras, o los métodos de screening, los cuales se van a desarrollar a lo largo de este trabajo.⁷

4) MÉTODOS DE SCREENING

4.1) DEFINICIÓN

Los métodos de screening son métodos analíticos de respuesta rápida de tipo binario (sí/no) informando sobre la presencia o ausencia de un analito o indicando si el analito está por encima o por debajo de un valor umbral.⁵ Por tanto, estos métodos proporcionan información cualitativa y semicuantitativa,⁹ aunque predomina el enfoque cualitativo.⁶

Estos métodos destacan por ser rápidos ya que, generalmente, no se suele necesitar un tratamiento previo de la muestra que se quiere analizar y, en caso de que fuera necesario, el tratamiento es sencillo, además, no se necesita un determinado tiempo para obtener la respuesta, sino que se obtiene inmediatamente. Además, la aplicación de estos métodos de screening supone una disminución en el coste y una mayor facilidad de empleo con respecto a los métodos convencionales ya que la instrumentación de estos últimos es más costosa y posee una mayor dificultad de manejo.

Por tanto, la principal ventaja por la que destacan estos métodos es su simplicidad^{2,6,10} y, por ello, tienen numerosas aplicaciones en campos como la medicina,¹¹ el medioambiente,^{6,12} la industria alimentaria,⁶ la industria farmacéutica¹³ o, incluso, en el ámbito forense¹⁴ que será en el que se centrará este trabajo. Existe un inconveniente importante a tener en cuenta a la hora de aplicar los métodos de screening, se trata de la posible obtención de falsos resultados como respuestas del método, es decir, la posibilidad de obtener una respuesta errónea.^{1,4} Los falsos resultados se explicarán más ampliamente en el apartado de propiedades analíticas de los métodos de screening.

4.2) CLASIFICACIÓN

Como se ha citado anteriormente, la tendencia de la Química Analítica actualmente es proporcionar al cliente, únicamente, la información que demanda y necesita. Esa información puede ser de dos tipos, según cuál sea el objetivo, por tanto, existen dos tipos de métodos de screening: el screening de analitos y el screening de muestras.^{6,15-17}

El screening de analitos se basa en determinar la presencia o ausencia de un analito o conjunto de analitos en una muestra compleja o en una multideterminación.^{6,10} Este tipo de screening presenta gran utilidad en el campo de la química combinatoria que tiene especial aplicación en la industria farmacéutica, más concretamente, en el proceso de diseño y desarrollo de nuevos fármacos. Para ello, se han desarrollado los conocidos como High Throughput Screening (HTS) que son métodos de screening de alto rendimiento que permiten obtener una elevada cantidad de moléculas relacionadas (denominadas bibliotecas) con una determinada aplicación, es decir, con una actividad biológica similar. La ventaja de la aplicación de estos métodos de screening es la posibilidad de realizar un gran número de reacciones en periodos de tiempo cortos.^{7,13}

Por otro lado, el screening de muestras está basado identificar y seleccionar aquellas muestras que contengan un analito o grupo de analitos por debajo o por encima de un valor umbral establecido. Este tipo de sistemas permiten filtrar las muestras según la respuesta que se obtiene, por lo que también se les conocen como métodos o sistemas de cribado.^{6,15,16} El proceso se inicia con el análisis de las muestras en cuestión, tras el cual se obtiene una respuesta. Si esta es positiva, es decir, el analito se encuentra presente en la muestra o sobrepasa un determinado valor umbral, esa muestra pasa a un segundo proceso de medida basado en un método cuantitativo convencional con objeto de confirmar la presencia del analito buscado, o en caso de que fuera necesario, determinar su concentración. En el caso de obtener una respuesta negativa, las muestras no se someten al segundo proceso de medida, por tanto, se descartan.¹⁰

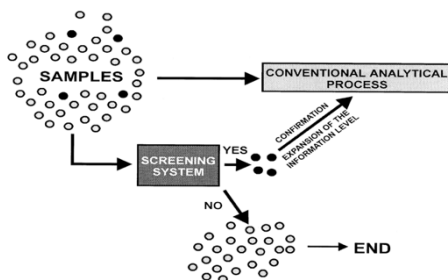


Figura 2. Proceso de la aplicación de un método de screening a un conjunto de muestras. Los puntos negros representan las muestras cuyo contenido en el analito de interés es superior al valor umbral establecido.¹⁰

A partir de este momento, todo lo que se expone sobre los métodos de screening hace referencia al screening de muestras ya que es el que más aplicación tiene hoy en día en diversos ámbitos de interés como pueden ser el medioambiente, la medicina, la industria alimentaria y la ciencia forense que es en la que se enfocará principalmente el trabajo en cuanto a aplicaciones.

El screening de muestras se puede clasificar teniendo en cuenta diferentes criterios. A continuación, se van a mostrar dos de las clasificaciones más frecuentes: según la complejidad de la muestra^{6,7,10} y según el sistema de detección que se utiliza en el método.^{5,15,16}

En alguna ocasión, es necesario un **tratamiento de la muestra** previo al método de screening en función de la complejidad de esta, por tanto, teniendo en cuenta este aspecto, se pueden clasificar los métodos de la siguiente manera:

- **Screening directo:** no es necesario el tratamiento previo de la muestra ya que se puede aplicar el método directamente. Es la situación más favorable que se puede encontrar con respecto a la complejidad de la muestra.^{6,7,10}

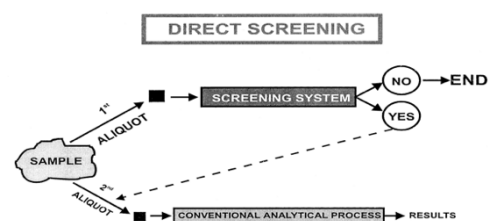


Figura 3. Proceso de screening directo.¹⁰

- Screening con tratamiento simple de muestra: para poder aplicar el método de screening es necesario un tratamiento no exhaustivo de la muestra, de manera rápida y sencilla, previo al proceso de screening.^{6,7,10}

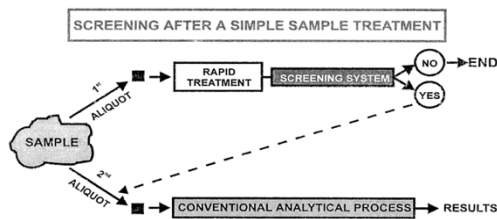


Figura 4. Proceso de screening con tratamiento simple de muestra.¹⁰

- Screening con tratamiento complejo de muestra: se necesita aplicar un tratamiento exhaustivo a la muestra antes de poder aplicar el método de screening pertinente. Se trata de la opción más desfavorable para la aplicación de métodos de screening ya que supone un gasto de tiempo mayor que en los casos anteriores.^{6,7,10}

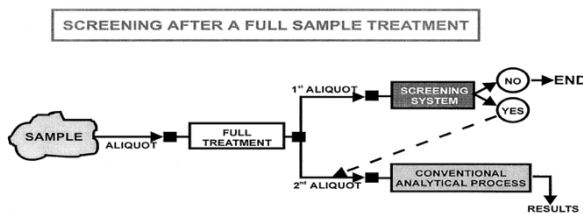


Figura 5. Proceso de screening con tratamiento complejo de muestra.¹⁰

Una vez que se han realizado las operaciones previas, en el caso de ser necesarias, se somete a la muestra al método de screening en el cual es posible tener diferentes sistemas de detección de la señal producida. La siguiente clasificación se va a realizar en función de cuál sea el **sistema de detección**:

- Screening sensorial: son métodos que utilizan los sentidos humanos como sistema de detección para reconocer e interpretar la respuesta. El sentido más empleado para registrar la respuesta es la vista ya que muchos de ellos se basan en reacciones colorimétricas de complejación o precipitación en las que el analito reacciona con unos reactivos específicos. En estos métodos se utilizan referencias predefinidas que relacionan el color con la concentración de analito presente en la muestra, de esta manera, se puede comparar el color producido y obtener una respuesta de tipo binario, o incluso, en algunos casos, se puede semicuantificar la señal obtenida según la intensidad del color.^{5,15,16} Uno de los ejemplos más conocidos y utilizados de screening sensorial son las tiras indicadoras de pH, en las que mediante comparación visual del color obtenido en la tira y una escala de colores de referencia, se puede semicuantificar el pH de la muestra en cuestión.¹⁸



Figura 6. Tiras indicadoras de pH con su escala de referencia de colores.¹⁸

- Screening instrumental: son métodos en los que se obtiene la respuesta instrumentalmente y, posteriormente, se convierte a una respuesta de tipo binario. Para dar esta respuesta de tipo binario, se compara la respuesta instrumental obtenida en la muestra con la respuesta instrumental obtenida en una muestra de referencia que contiene el analito en su valor umbral, de esta forma, se puede determinar si el analito está por encima o por debajo de ese valor umbral de referencia. Por tanto, estos métodos son métodos cuantitativos aplicados al análisis cualitativo.^{5,15,16}

Un ejemplo de screening instrumental, que se utiliza para controlar un problema medioambiental de gran importancia, es la determinación de herbicidas en muestras de agua por fluorescencia molecular. En primer lugar, se añaden los reactivos necesarios para producir la reacción de fluorescencia y, seguidamente, se mide la fluorescencia con un espectrofluorímetro. En función de la concentración obtenida, comparándola con el límite preestablecido, se obtiene una respuesta positiva o negativa, es decir, si se considera que ese agua medioambiental está contaminada por herbicidas o no.¹⁹

Se pueden realizar otras clasificaciones, por ejemplo, teniendo en cuenta el estado de agregación de la muestra (sólido, líquido o gas) o el lugar de aplicación del método (in situ o en el laboratorio)¹⁰ pero no tienen tanta importancia como las expuestas anteriormente.

5) POSIBILIDADES ANALÍTICAS DE LOS MÉTODOS DE SCREENING

5.1) METODOLOGÍA Y TÉCNICAS

Existe una amplia variedad de técnicas y metodologías aplicables a los métodos de screening, lo que les permite adaptarse fácilmente a las necesidades requeridas en cada una de sus aplicaciones.⁶

En el campo de los métodos de screening está muy extendido el uso de la **Química Seca**, es decir, la química en fase sólida debido a las numerosas ventajas que presenta. En esta técnica se inmovilizan y deshidratan los reactivos necesarios para que se produzca la reacción sobre un soporte sólido de matriz porosa, eliminando así cualquier reactivo líquido y, por tanto, cualquier tipo de problema relacionado con los líquidos como pueden ser contaminaciones y evaporaciones de los reactivos. Las técnicas en Química Seca destacan por su sencilla aplicación ya que únicamente es necesario aplicar la muestra sobre los reactivos en fase sólida. Existen dos tipos de sistemas reactivos en Química Seca según el soporte que se utiliza para inmovilizar los reactivos.²⁰

- Los slides son películas multicapa muy finas en las que la reacción se produce a través de las diferentes capas que, generalmente, son cuatro: la capa de difusión la cual permite difundir uniformemente la muestra, la capa de reactivo en la que se encuentran las sustancias necesarias para que se lleve a cabo la reacción, la capa de indicador en la que el producto de la reacción forma un complejo colorido con una sustancia específica, y por último la capa de soporte que está fabricada con un material transparente de plástico que permite el paso de la luz para que la reacción pueda ser medida por espectrofotometría, o por inspección visual, en la que se mide el cambio de coloración una vez que tiene lugar la reacción. Este tipo de slide descrito se denomina slide colorimétrico y es el más común.²⁰

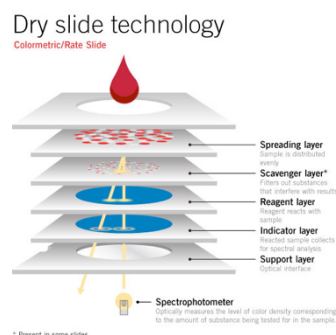


Figura 7. Slide colorimétrico en el que se indican las diferentes capas expuestas anteriormente. La capa de filtrado se encuentra solo en determinados slides y sirve para filtrar las sustancias que pueden interferir en el resultado.²¹

Existen diferentes tipos de slides según la metodología que se utiliza:

- Slides potenciométricos: miden la diferencia de potencial que se establece entre la muestra y una solución de electrolitos de referencia gracias a un electrodo selectivo de iones (ESI). Se utilizan para la determinación de electrolitos como cloruro, sodio o potasio.²⁰
- Slides enzimáticos: la señal se mide por espectrofotometría realizando varias lecturas durante la reacción. Se emplean en reacciones en las que intervienen enzimas como la lactato deshidrogenasa, la lipasa o la amilasa.²²
- Las tiras reactivas están compuestas por un soporte de plástico que contiene una matriz que suele ser de celulosa en la que están impregnados los reactivos necesarios para que se produzca la reacción deseada. Para realizar la determinación la tira reactiva se sumerge en la disolución de la muestra a analizar o bien se deposita sobre ella un pequeño volumen de muestra. La medición de la señal se realiza midiendo el cambio de coloración de la reacción una vez que ha tenido lugar, y se puede realizar o bien por inspección visual o bien por espectrometría como se ha citado anteriormente.²³ Por ejemplo, el papel indicador de pH que se ha puesto nombrado como método de screening sensorial es una tira reactiva, pero una de las aplicaciones más conocidas es el test de embarazo^{23,24} que se basa en un inmunoensayo cromatográfico en la que se determina la hormona hCG (Gonadotropina Coriónica Humana) que es producida por la placenta al cabo de muy poco tiempo desde que se produce la implantación del embrión y, por tanto, se puede detectar en la orina de la paciente. La tira reactiva consta de una membrana en la que se inmovilizan anticuerpos específicos de la hCG en la línea de test. Cuando se sumerge la tira en la muestra de orina, esta reacciona con las partículas de oro coloidal fijadas con anticuerpos anti-hCG previamente inmovilizados en la tira de reacción, avanzando hacia el otro extremo de la tira por acción capilar. Si el resultado es positivo, los anticuerpos específicos fijados en la membrana reaccionan con la mezcla de la muestra y aparecen unas líneas coloreadas. Siempre aparece una línea roja como control para poder comparar y verificar que se ha realizado el ensayo en las condiciones adecuadas. Se trata de un método de screening sensorial ya que la lectura de la respuesta se realiza por inspección visual.²⁵

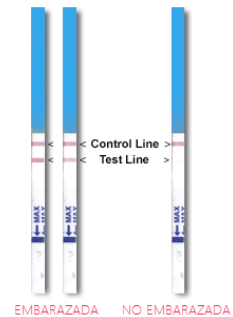
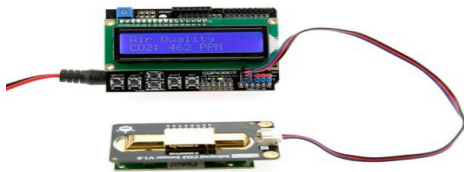


Figura 8. Tiras reactivas para el test de embarazo.²⁴

Además de la Química Seca, otra metodología que está en auge es la de los **sensores** que son dispositivos capaces de transformar la información química que se obtiene en el proceso analítico en una señal, generalmente eléctrica, útil que el instrumento de medida sí que es capaz de interpretar, simplificando el proceso. Los sensores están compuestos por dos elementos: un receptor y un transductor. El receptor se encarga de recibir la información química que, normalmente es la concentración de analito que está presente en una muestra, y transformarla en una señal de tipo químico o físico. El transductor es el que se encarga de transformar la señal química o física obtenida por el detector en una señal de tipo eléctrico que el instrumento es capaz de reconocer e interpretar. Los sensores se pueden clasificar según el tipo de técnica que se emplee en la medida de la señal que suministra el transductor²⁵ y se dividen en los siguientes grupos:

- **Electroquímicos:** son los más comunes. Transforman una señal química, que suele ser la concentración de analito en una muestra, en una eléctrica que puede ser medida por diferentes técnicas como son la potenciometría, amperometría o conductimetría, por eso se clasifican los sensores electroquímicos en sensores potenciométricos, amperométricos o conductimétricos.
- **Ópticos:** la señal que percibe el receptor es debida a la interacción de la radiación electromagnética con el analito de interés. Pueden detectar la interacción con la radiación de diferentes zonas del espectro electromagnético.
- **Piezoeléctricos:** la señal que llega al detector es un cambio de masa debido a la interacción del analito con el sensor. Están compuestos por materiales piezoeléctricos, es decir, materiales que son capaces de transformar energía mecánica y vibracional en energía eléctrica.

Una de las aplicaciones con mayor interés actual es el control y medición de gases contaminantes en la atmósfera debido al problema medioambiental que suponen. Existen diferentes tipos de sensores, electroquímicos, ópticos y piezoeléctricos, que permiten determinar numerosos gases contaminantes in situ para controlar la calidad del aire, como por ejemplo, CO₂, CO, NO_x, H₂S, etc.²⁶

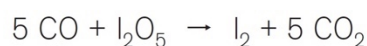


*Figura 9. Sensor óptico de CO₂ basado en la técnica de absorción en la región del infrarrojo. El sensor emite radiación electromagnética infrarroja por lo que cuando el CO₂ pasa entre el emisor de luz y el receptor absorbe radiación, entonces, llega menor intensidad de luz al receptor que transforma en concentración de CO₂.*²⁷

Existen otro tipo de sensores totalmente diferentes a los que se acaban de exponer: los sensores químicos colorimétricos, más conocidos como **tubos colorimétricos** los cuales se emplean para la determinación de gases. Se basan en tubos de vidrio en cuyo interior se encuentra un material poroso impregnado de los reactivos necesarios para que se produzca una reacción de decoloración entre el gas o gases de interés y estos. Su manejo es muy sencillo haciéndose pasar directamente con ayuda de una bomba el aire presente del lugar en el se quiere realizar la determinación. La concentración del gas que se quiere determinar está relacionada con la longitud que alcanza la decoloración sobre una escala graduada a lo largo del tubo pero, en ocasiones, este tipo de medida no resulta útil por lo que se procede a indicar la concentración del gas basándose en la intensidad de la decoloración y comparándola con unos estándares de referencia.^{28,29} Entre las aplicaciones de mayor interés cabe destacar la del ámbito medioambiental, debido a la relevancia del problema de gases contaminantes que existe en la actualidad. Por ejemplo, estos tubos colorimétricos se emplean para medir el nivel de CO que se emite a la atmósfera a causa de la combustión interna de los motores de los vehículos que circulan por las ciudades y, así, poder controlar la calidad del aire.²⁹



*Figura 10. Tubos Dräger para la medición de CO en un rango de 2 a 60 ppm con 10 emboladas con un tiempo de medición de aproximadamente 4 minutos. En el tubo de la izquierda no se ha introducido gas y presenta una coloración blanca, en cambio, en el tubo de la derecha se aprecia el cambio de coloración a marrón rosado y verde debido a la presencia de CO. Se produce la siguiente reacción:*²⁸



Todas estas metodologías que se acaban de exponer se pueden combinar en dispositivos comerciales denominados **test kits** que contienen todos los reactivos e instrumentos necesarios para llevar a cabo un análisis específico con las instrucciones necesarias para su uso. Una de las mayores ventajas que poseen es que son portátiles lo que permite realizar los ensayos in situ de manera rápida y sencilla.³⁰ Por lo general, los test kits se basan en reacciones colorimétricas en las que la concentración es proporcional a la intensidad del color obtenido en la reacción, permitiendo comparar la respuesta colorimétrica obtenida con unos colores de referencia. Cuando no se puede llevar a cabo la determinación del analito de interés por medio de reacciones colorimétricas, existen otras metodologías que se utilizan en los test kits como, por ejemplo, la titrimetría que consiste en un análisis volumétrico en el que se añade gota a gota el reactivo a la muestra junto con un indicador que vira en el punto final de la valoración. En este tipo de análisis se cuentan las gotas que se han añadido hasta que se ha llegado al punto final de la valoración y se hace una conversión del número de gotas a unidades de concentración según las instrucciones que contiene el test kit en cuestión.³¹

Un ejemplo de aplicación de un test kit es el que se utiliza para controlar la calidad del agua que es de gran importancia ya si estuviera contaminada, podría suponer un problema medioambiental. A continuación, se muestra un ejemplo de kit para el análisis de aguas, más concretamente, para la determinación de nitritos en aguas.³¹ Los nitritos en concentraciones elevadas en aguas de consumo pueden provocar la enfermedad conocida como metahemoglobinemia, sobre todo en niños y lactantes,³² la cual supone la presencia de más del 1% de metahemoglobina del valor total de hemoglobina en sangre. La metahemoglobina se forma cuando el hierro pasa de estado de oxidación (II) a estado de oxidación (III) en la hemoglobina y disminuye la capacidad para transportar el oxígeno disuelto en la sangre lo que puede ocasionar un grave problema para la salud.³³ Además, los nitritos reaccionan con aminas secundarias en medio ácido, como lo es el medio gástrico, formando nitrosaminas que son compuestos potencialmente carcinógenos.³²



Figura 11. Kit de ensayo para el análisis de aguas VISOCOLOR® nitrito. Consiste en un ensayo colorimétrico en el que la sulfanilamida es diazotizada por nitrito en medio ácido dando lugar a una sal de diazonio que se acopla con una amina formando un colorante rojo intenso que se evalúa por comparación visual del color obtenido con los colores de referencia que contiene el kit.³¹

Además de los test kits químicos, es decir, los que se acaban de exponer, existen otros de tipo biológico como pueden ser ensayos enzimáticos que son utilizados en la industria alimentaria para la determinación de componentes de los alimentos como pueden ser azúcares, alcoholes o ácidos orgánicos entre otros y poder controlar la seguridad alimentaria. Este tipo de ensayos se basan en la medición de la actividad enzimática de una enzima específica con el analito de interés. Las coenzimas NADH y NADPH participan en la mayoría de las reacciones bioquímicas y absorben luz UV de 340 nm en su forma reducida pero no en la oxidada (NAD⁺ y NADP⁺), por lo que se utiliza esta propiedad para realizar la medición del descenso de absorbancia con un fotómetro, a medida que se consumen las coenzimas.³⁴ Otro tipo de test kits biológicos son los inmunoensayos entre los que destaca la conocida técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) la cual se va a exponer más ampliamente a continuación debido a su gran importancia en el campo de la medicina.

El **ELISA** sirve para detectar selectivamente antígenos (Ag) diana,^{35,36} es decir, sustancias que el organismo reconoce como extrañas, ya sean de origen exógeno o endógeno, pero no necesariamente desencadenan una respuesta inmune, o anticuerpos (Ac) diana que son proteínas producidas como respuesta a la presencia una sustancia extraña, es decir, de un antígeno y tienen gran afinidad y especificidad por estos.³⁷ Tanto los Ag como los Ac que se quieren detectar se encuentran en solución. Existen diferentes variantes de ensayos del tipo ELISA, a continuación, se van a explicar suponiendo que el analito es el Ag (en el caso en el que el Ac fuera el analito el proceso sería el mismo, pero cambiando el Ag por Ac y viceversa):

- **ELISA directo:** consiste en inmovilizar sobre una placa de 96 pocillos, generalmente, el Ag que se encuentra presente en la solución muestra. Se añade a los pocillos un Ac específico para ese Ag unido a una enzima, entonces, si se encuentra presente el Ag en la muestra se formarán inmunocomplejos Ag-Ac con actividad enzimática. Se realiza un lavado para eliminar los Ac unidos a enzimas que no han formado complejos con los Ag y otros compuestos y, finalmente, se añade un sustrato que reacciona con la enzima de los complejos Ag-Ac dando lugar a la aparición de color que es medido por espectrofotometría o por simple inspección visual. Por tanto, si en la muestra existe el Ag aparecerá un cambio de color, por el contrario, si no está presente, no se producirá reacción y la coloración no cambiará.

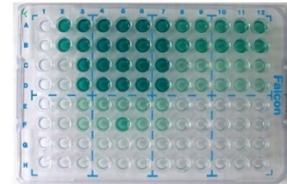


Figura 12. Placa con 96 pocillos en la que se ha realizado el ELISA. La coloración verde indica la presencia de la proteína analito.³⁸

- **ELISA indirecto:** al igual que en el ELISA directo, se inmoviliza el Ag de interés sobre la placa y, a continuación, se añade un Ac primario sin marcar específico para el Ag de interés que se une al este y un Ac secundario marcado con una enzima que se une al Ac primario. Se añade el sustrato que reacciona con la enzima y se produce la coloración. La ventaja del ELISA indirecto es la amplificación de la señal debido a que el Ac primario contiene varios puntos de unión a los que se pueden unir más de un Ac secundario marcado, por lo que al añadirse el sustrato hay más cantidad de enzimas que reaccionan y, por tanto, se produce una coloración con mayor intensidad.
- **ELISA sándwich:** en este tipo de ensayo se inmoviliza sobre la placa, a diferencia de los expuestos anteriormente, Ac sin marcar denominados Ac de captura y sobre ellos se añade la solución de muestra. Si existen Ag serán captados por los Ac de captura. Seguidamente, se añade un segundo Ac marcado con enzima denominado Ac de detección que se une a los Ag unidos a su vez a los Ac de captura quedando así los Ag entre los Ac de captura que se encuentran en la base y los Ac de detección, de ahí su denominación de tipo sándwich. En el caso de que no esté marcado el Ac de detección se añade otro Ac marcado que se une al de detección. Finalmente, se adiciona el sustrato que reacciona con la enzima y produce el color.
- **ELISA competitivo:** como primer paso se inmoviliza sobre la placa un Ag de referencia que es el mismo que el que contiene la muestra. Por otra parte, se incuba un exceso de Ac primario sin marcar con la muestra, formándose complejos Ac-Ag. Esta solución que contiene los complejos es añadida sobre la placa donde se encuentran inmovilizados los Ag de referencia que compite con el Ag de la muestra por unirse al Ac. Posteriormente, se añade un Ac secundario marcado con una enzima que se une al Ac primario que está unido con el Ag de referencia. Para finalizar, se adiciona

el sustrato que reacciona con las enzimas produciendo el color siendo la intensidad de este inversamente proporcional a la cantidad de Ag presente en la muestra.^{35,38,39}

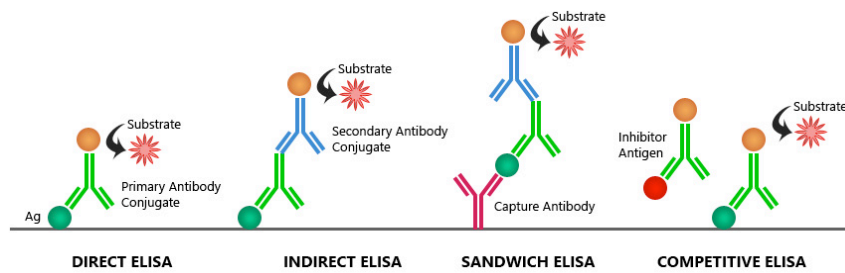


Figura 13. Tipos de ELISA que existen.⁴¹

El test de embarazo que se ha expuesto como aplicación de tira reactiva se basa en el mismo principio que el ELISA pero en vez de inmovilizar los Ac sobre la placa se fijan a la tira reactiva.

Otro ejemplo de inmunoensayo del tipo ELISA es su aplicación, como prueba de diagnóstico, para la detección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH)^{42,43} que es un retrovirus, es decir, un virus que posee RNA como material genético y que lo convierte en DNA a través de una enzima denominada transcriptasa inversa al penetrar en la célula huésped. Lo que produce es una destrucción de los linfocitos CD4, encargados de la creación de anticuerpos, por lo que el sistema inmunitario se va destruyendo progresivamente lo que supone una disminución en la capacidad de defensa contra enfermedades infecciosas y ciertas clases de tumores.⁴⁴ Antes de que el organismo cree anticuerpos contra el VIH, el nivel de antígeno p24 en sangre es muy elevado por lo que es el antígeno que se utiliza con el ELISA para detectar el VIH. Pero la ventaja que tiene este inmunoensayo en la detección del VIH es que además de detectar el antígeno p24 es capaz de detectar los anticuerpos una vez creados, el VIH-1 y el VIH-2 que corresponden a dos tipos de VIH diferentes. Tras realizar el ELISA, si el resultado es positivo, es necesario la confirmación mediante una prueba más concreta y precisa.^{42,43}

5.2) CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA Y CALIDAD DE LOS MÉTODOS

5.2.1) PROPIEDADES ANALÍTICAS

En Química Analítica, es muy importante que el proceso analítico y los resultados obtenidos a través de los métodos analíticos tengan una calidad óptima con el fin de que los resultados proporcionados al cliente posean una buena aceptación y credibilidad. Para poder establecer la calidad del método analítico es necesario considerar las propiedades analíticas ya que son buenos indicadores de la calidad.

Respecto a la calidad de los resultados, los indicadores de la calidad son las propiedades analíticas supremas las cuales son la representatividad que hace referencia al grado de concordancia entre la muestra que llega al laboratorio y el objeto de estudio, es decir, la información requerida por el cliente; y la exactitud que representa el grado de concordancia entre el resultado obtenido y el resultado considerado como verdadero.^{1,4,15} Esta última está relacionada con dos conceptos metrológicos muy importantes que son la incertidumbre la cual representa una dispersión alrededor del valor considerado como verdadero en la que se encuentra el resultado obtenido con el método, y la trazabilidad, propiedad asociada al resultado de una medida que puede ser comparada con unos valores de referencia teniendo en cuenta las incertidumbres.^{46,47}

Para evaluar la calidad del proceso analítico se tienen que estudiar las propiedades analíticas básicas, las cuales son la precisión, que indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el mismo método de manera repetida e independiente; la robustez, la cual evalúa la resistencia al cambio en los resultados al modificar levemente las condiciones experimentales; la selectividad que es la capacidad del método para generar una respuesta que solo depende del analito de interés, es decir, indica el grado de interferencia de unas especies sobre otras; y la sensibilidad que denota la capacidad del método de discriminar entre concentraciones semejantes de analito o bien de detectar o determinar la mínima concentración de analito. Además de las propiedades analíticas básicas que se acaban de definir, también hay que tener en cuenta las propiedades analíticas productivas que son la rapidez, los costes y los factores relacionados con el personal.^{1,4 15}

Como se ha citado anteriormente, los métodos de screening son métodos analíticos de respuesta rápida cualitativos y semicuantitativos, por lo que hay que hacer un estudio particular de sus propiedades analíticas debido a que algunas de las propiedades mencionadas anteriormente no son atribuibles a los métodos cualitativos.^{4,48} A continuación, se van a exponer los parámetros que caracterizan, en concreto, a los métodos cualitativos y, por tanto, a los métodos de screening.

Como ya se mencionó en el apartado de definición, el inconveniente de los métodos de screening es la posible obtención de falsos resultados. El conjunto de **falsos resultados** está compuesto por los falsos positivos (FP) (respuesta positiva obtenida por el método de screening pero negativa obtenida por el método que se toma como referencia) y por los falsos negativos (FN) (respuesta negativa por el método de screening pero positiva por el método de referencia). Estos conceptos son específicos de los métodos cualitativos ya que no tienen su equivalente en los métodos cuantitativos. Existen otros conceptos como verdaderos positivos (VP) que son los resultados con respuesta positiva obtenida tanto por el método de screening como por el de referencia, y los verdaderos negativos (VN) que son los resultados con respuesta negativa obtenida por ambos métodos. A la proporción de resultados correctos, es decir, la proporción de VP + VN se le denomina **exactitud diagnóstica (ED)** y expresa el grado de concordancia entre el resultado obtenido y el valor de referencia tomado como verdadero.^{1,5,14}

$$ED = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN}$$

Tanto la exactitud como la precisión no son aplicables a los métodos de screening ya que por su definición no son atribuibles a métodos cualitativos. Como se ha explicado anteriormente, la incertidumbre está relacionada con la exactitud y tampoco se puede aplicar directamente al análisis cualitativo por lo que surge una nueva propiedad analítica suprema denominada **no-fiabilidad** (también se puede trabajar con el término **fiabilidad**) que engloba a la exactitud y a la precisión y, además, depende de la robustez, la selectividad y la sensibilidad.^{1,4} Esta propiedad expresa la proporción de respuestas incorrectas de tipo SÍ (falso positivo) y de tipo NO (falso negativo)¹⁷ de n alícuotas (los estudios se suelen realizar con n>30) de una muestra patrón o un material de referencia certificado (CRM) y sometidas al mismo método de screening.¹ Es decir, se tiene que asumir un cierto riesgo, con un determinado nivel de probabilidad, de que los métodos de screening conduzcan a resultados incorrectos.⁴⁹ Un aspecto muy importante a tener en cuenta es que la fiabilidad está relacionada de manera directa con la concentración de analito, es decir, cuanto mayor sea la

concentración de analito, mayor fiabilidad se obtendrá. El porcentaje de fiabilidad se obtiene de la siguiente manera:¹

$$\% \text{ fiabilidad} = 100\% - \% \text{ falsos positivos} - \% \text{ falsos negativos}$$

En lo referente al otro concepto metrológico derivado de la exactitud, la **trazabilidad**, como se ha visto anteriormente, es una propiedad asociada al resultado de una medida que puede ser comparada con unos valores de referencia teniendo en cuenta las incertidumbres. En el caso de los métodos de screening, las incertidumbres se sustituyen por la no-fiabilidad ya que, como se ha citado, la incertidumbre no es aplicable a métodos cualitativos. Generalmente, en los métodos cuantitativos se utilizan Materiales Certificados de Referencia, CRMs, para realizar las comparaciones necesarias, en cambio, en lo que respecta a métodos cualitativos, no existen CRMs por lo que las comparaciones se realizan en consideración a métodos de referencia, MR, que, frecuentemente, son métodos cuantitativos.⁵

Por tanto, de las propiedades analíticas supremas, la exactitud no es aplicable a los métodos de screening, en cambio, sí lo es la **representatividad** que mantiene su significado tanto para análisis cuantitativo como para análisis cualitativo.¹

Con lo que respecta a las propiedades analíticas básicas, la precisión está incluida en la fiabilidad como se acaba de mencionar, y la sensibilidad, la selectividad y la robustez sufren algunas modificaciones en cuanto a conceptos para los métodos cualitativos, es decir, los métodos de screening, con respecto a los métodos cuantitativos. Se van a definir a continuación.

La **sensibilidad (S)**, aplicada a un método de screening, es decir, a un método cualitativo, es la capacidad del método de obtener un resultado positivo cuando realmente lo es. Por tanto, se puede definir como la proporción de respuestas positivas que genera el método para muestras que se sabe que contienen el analito.^{1,16,48} Generalmente, se expresa como probabilidad y se puede calcular como el cociente entre los resultados obtenidos por el método de screening como positivos, los verdaderos positivos (VP), y el número total de resultados positivos conocidos, es decir, los verdaderos positivos (VP) junto con los falsos negativos (FN) :¹⁶

$$S = \frac{VP}{VP + FN}$$

La selectividad pasa a denominarse **especificidad (E)** y es definida, de manera análoga a la sensibilidad, como la proporción de verdaderos negativos que son correctamente identificados por el método de screening como respuestas negativas.¹⁶ También se puede definir como la capacidad del método de detectar el analito en la matriz en una forma determinada o como el grado de interferencia que tienen otras sustancias que se encuentran en la matriz, diferentes al analito, en el momento de la detección.⁵⁰ Se calcula de la siguiente manera:¹⁶

$$E = \frac{VN}{VN + FP}$$

La **robustez** representa el grado de resistencia del método de screening a sufrir un cambio en la respuesta de tipo binario al modificar ligeramente las condiciones experimentales sobre diferentes

alícuotas de la misma muestra. Por consiguiente, la robustez permite establecer qué variables experimentales son críticas para poder asegurar la fiabilidad de la respuesta obtenida con el método.¹

Seguidamente, se van a exponer otros parámetros característicos de los métodos de screening.

El **límite de detección (LOD)** está relacionado con la sensibilidad ya que es el único parámetro que se puede utilizar para expresar matemáticamente esta propiedad. Se define como el parámetro que expresa la mínima concentración de analito que proporciona una señal distinguible, estadísticamente, de una señal correspondiente a un blanco, es decir, a una muestra que no contiene analito.¹ Existen otras definiciones del LOD en las que se tienen en cuenta los errores de tipo alfa (probabilidad de obtener un falso positivo) y de tipo beta (probabilidad de obtener un falso negativo), dependiendo de la definición. Si se considera el LOD como la mínima concentración de analito que el método puede detectar como una respuesta positiva en una matriz, solamente se tiene en cuenta la probabilidad de cometer un error de tipo beta que, por lo general, se suele considerar del 5%. Esta definición se utiliza cuando lo que interesa evaluar es la máxima concentración permitida de analito en una muestra y, en este caso, el LOD coincide con el valor de corte y con el límite superior de la zona de no-fiabilidad donde la sensibilidad es del 95%. El caso contrario es la evaluación de la mínima concentración permitida de analito, entonces, solo se considera la probabilidad de cometer un error de tipo alfa, también generalmente se considera del 5%. En esta situación, el LOD coincide con el límite inferior de la región de no-fiabilidad.

El **valor del límite de corte o Cut Off** representa el nivel de concentración en el cual el método de screening es capaz de distinguir las muestras con una cierta probabilidad de cometer un error que, como ya he citado anteriormente, suele considerarse del 5%. No debe confundirse con el **valor umbral** que es la concentración límite impuesta por el cliente.¹⁶

Una vez definidos los conceptos de falsos resultados, cut-off y valor umbral, se puede definir otro parámetro analítico característico de los métodos cualitativos que es la **región de no-fiabilidad**, la cual muestra el intervalo de concentraciones de analito en torno al cut-off o al valor umbral en el que se producen falsos resultados con una cierta probabilidad que suele ser del 5%.¹

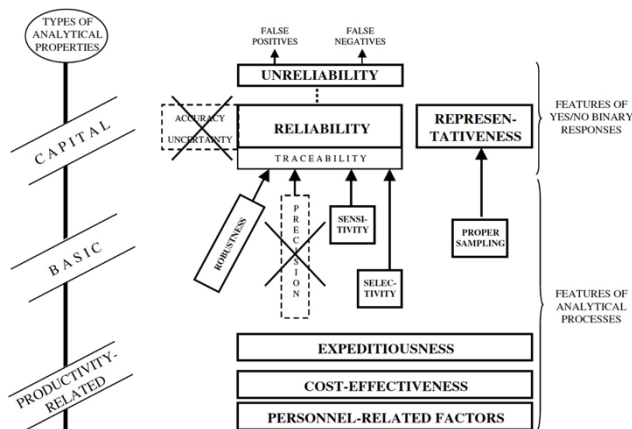


Figura 14. Esquema resumen de las propiedades analíticas. Las que están tachadas no son aplicables a los métodos cualitativos, por tanto, tampoco a los métodos de screening.¹

Concluyendo, el resultado obtenido mediante un método cuantitativo se expresa como un valor estimado del valor verdadero, acompañado de su incertidumbre que está asociada a la dispersión de valores o el intervalo en el que se encuentra el valor verdadero con una cierta probabilidad:^{3,51}

$$\text{valor estimado} \pm \text{incertidumbre}$$

A diferencia de los métodos de screening, ya que al tratarse de métodos cualitativos, el resultado se expresa como una respuesta de tipo binario SÍ/NO acompañada de la no-fiabilidad, es decir, la probabilidad de error, que puede ser expresada como la región de no-fiabilidad:^{5,51}

$$\text{SÍ/NO} \pm \text{región de no - fiabilidad}$$

5.2.2) VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN

Antes de que un método pueda ser implementado en un laboratorio para su uso en el análisis de rutina, debe ser validado.^{16,51,52} Según la norma ISO 8402, la validación de un método se define de la siguiente manera: “Es la confirmación mediante el examen y la provisión de una evidencia objetiva de que se han satisfecho unos requisitos particulares para un uso pretendido y específico.”⁵³

La validación se utiliza para caracterizar los métodos⁵⁴ y, previamente, es necesario establecer unos requisitos de calidad para poder llevarla a cabo.^{16,51,52} Específicamente, en el análisis cualitativo, la validación está relacionada con la obtención de un resultado que cumpla con los requisitos preestablecidos, siendo muy importante que el objetivo del método se adecúe a las necesidades del cliente. Estos parámetros de calidad son los que se han expuesto anteriormente, en concreto, los parámetros característicos de los métodos de screening, como son el límite de detección (LOD), la selectividad, la especificidad y la no-fiabilidad entre otros. Para evaluar estos parámetros existen diferentes metodologías que se van a explicar a continuación:¹⁶

- **Tablas de Contingencia:** muestran la probabilidad de que se den los VP, VN, FP y FN, comparando los resultados obtenidos por el método de screening con los obtenidos por un método de referencia, por tanto, a partir de ellas se pueden calcular los falsos resultados. Cabe destacar que las tablas de contingencia dan una visión global de la probabilidad y no son probabilidades individuales asociadas a cada muestra. De hecho, los valores dependen del número de muestras analizadas. Con ellos se puede calcular la sensibilidad y la especificidad.^{16,48}

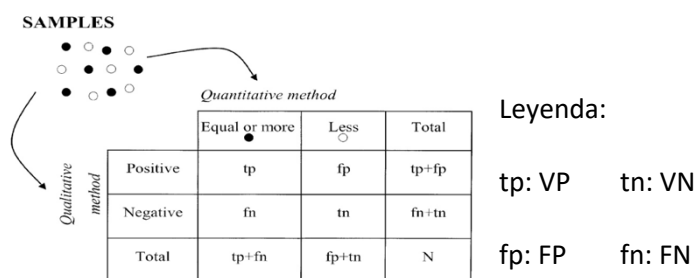


Figura 15. Tabla de contingencia 2x2 en la que se compara el método de screening con el método de referencia.¹⁶

- **Teorema de Bayes:** permite calcular la probabilidad de que el método de screening dé un resultado verdadero, ya sea positivo o negativo, cuando realmente es verdadero.¹⁶ A esta probabilidad se le denomina probabilidad condicional y es individual, a diferencia de las probabilidades que se dan en las tablas de contingencia, ya que es calculada para cada muestra sometida al proceso de screening. De nuevo, se pueden calcular la especificidad, la sensibilidad y los falsos resultados.⁵⁵ Este teorema se utiliza con gran frecuencia en el análisis forense.⁴⁹
- **Test Estadístico de Hipótesis:** se basa en la comparación de la respuesta instrumental de una muestra obtenida mediante el método de screening con la respuesta, obtenida en las mismas condiciones y con el mismo método, de una muestra la cual contiene el analito en una

concentración específica. Este test solamente es válido cuando se obtienen respuestas instrumentales ya que si la respuesta es de tipo sensorial no se puede cuantificar por encima o por debajo del valor umbral. Este Test utiliza el error de tipo alfa (probabilidad de cometer un falso positivo) y el error de tipo beta (probabilidad de cometer un falso negativo) permitiendo estimar la fiabilidad del método de screening.^{16,55}

- **Curvas Características:** son curvas en las que se representa la probabilidad de obtener resultados positivos por el método de screening frente a diferentes niveles de concentración del analito de interés. Al realizar esta representación, se obtienen curvas sigmoideas con una pendiente y amplitud características de cada método de screening.^{16,55} Además de poderse calcular los falsos resultados (FP y FN), la sensibilidad y la selectividad, a partir de estas Curvas se puede obtener el límite de detección (LD), el límite de corte y el rango de no-fiabilidad en el que se puede aplicar el método de screening. Estas Curvas tienen la desventaja de que se necesita la realización de muchas muestras para cada nivel de concentración.¹⁶

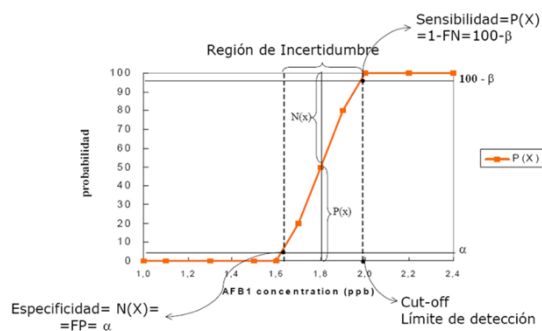


Figura 16. Curva Característica en la que se indican la especificidad, la sensibilidad la región de incertidumbre (no-fiabilidad), el límite de detección y el límite de corte.¹⁵

Una vez que se ha validado el método empleando las diferentes maneras metodologías para evaluar los parámetros de calidad necesarios, se lleva a cabo la verificación, que no debe confundirse con la validación ya que tienen diferentes enfoques.

La verificación consiste en poder demostrar objetivamente que los requisitos que se establecen en cada fase del método estudiado se cumplen correctamente, es decir, la validación se enfoca más a los requisitos que afectan al resultado, mientras que la validación se orienta hacia los requisitos de las diferentes etapas del método.⁵²

6) APLICACIONES

Durante el trabajo se han ido exponiendo las aplicaciones más importantes de los métodos de screening. Por ejemplo, en el **ámbito medioambiental** se han explicado aplicaciones para el control de gases contaminantes en el aire, como el sensor de CO₂, y sustancias tóxicas en el agua como el test kit para análisis de nitritos. También se ha citado su aplicación en la **industria alimentaria** donde destacan los test kit basados en ensayos enzimáticos que permiten detectar diversos componentes en los alimentos. Una de las aplicaciones que está en auge y desarrollo actualmente son **las pruebas de diagnóstico**, que se han nombrado al exponer el ejemplo de la detección del VIH. Debido al gran impacto e importancia que tienen sobre las salud de las personas se van a comentar a continuación junto con algún ejemplo.

Las **pruebas de diagnóstico** se realizan sobre pacientes asintomáticos que tienen una cierta probabilidad de padecer una enfermedad, deficiencia o riesgo no conocidos con el fin de realizar un

diagnóstico presuntivo que no se debe confundir con un diagnóstico de confirmación ya que este se realiza cuando ya se ha desarrollado la enfermedad y existen síntomas. Una de las principales ventajas de estas pruebas es que no son invasivas a diferencia de las técnicas de confirmación que sí lo son.¹¹

Dentro de las pruebas de diagnóstico cabe hacer especial mención de las biopsias líquidas que constituyen una técnica innovadora y no invasiva en la detección y seguimiento del cáncer ya que detecta material tumoral que es liberado por los tumores al torrente sanguíneo, concretamente, los biomarcadores tumorales que se analizan en las biopsias líquidas son el DNA tumoral circulante (ctDNA) y las células tumorales circulantes (CTCs). Se trata de una alternativa mucho más rápida y con menores costes a las biopsias de tejidos invasivas que conllevan la extracción de un fragmento del tumor que, en ocasiones, es complicado extraer debido a su localización, por lo que este problema se facilita con las biopsias líquidas ya que se realiza el análisis en sangre. Otra de las ventajas que presentan las biopsias líquidas es que representan de manera heterogénea el material tumoral que se encuentra en el paciente mientras que las biopsias de tejidos son representativas exclusivamente de una zona concreta del tumor.^{56,57} También se puede determinar el material tumoral en otro tipo de fluidos como orina, saliva, líquido cefalorraquídeo o derrames pleurales. Una vez que se extrae el fluido del paciente se analiza por diferentes técnicas para encontrar los biomarcadores tumorales.⁵⁶ Una de las aplicaciones actuales de las biopsias líquidas es la detección del cáncer colorrectal que suele iniciarse como pólipos en el colon o en el recto y se van desarrollando hasta convertirse en tumores por lo que el principal objetivo de la biopsia líquida es detectarlo en un estado temprano y poder extirpar los pólipos antes de que deriven en cáncer.⁵⁸ En este caso, se detecta ctDNA que resulta ser más largo que los fragmentos de DNA normales aunque las células necróticas también pueden liberar fragmentos más largos de DNA por lo que si el paciente presenta heridas o inflamaciones puede dar lugar a un falso positivo. Por este motivo, además del ctDNA se detecta el nivel de metilación del gen SEPT9 ya que se ha demostrado que esta metilación está ligada al cáncer colorrectal. Si esta prueba diera un resultado positivo se pasaría a realizar una prueba de confirmación como, por ejemplo, una colonoscopia.^{57,59,60}

Además de la biopsia líquida, existen otras pruebas de diagnóstico para la detección de sangre en heces que es un posible síntoma de cáncer colorrectal como son el test inmunoquímico en heces que utiliza un anticuerpo para capturar la hemoglobina de la sangre,⁶¹ o el test de sangre oculta en heces con guayacol que es un compuesto fenólico al que se le añade peróxido de hidrógeno oxidándose a una quinona que en presencia de sangre produce un color azul.⁶²

6.1) ÁMBITO FORENSE

Como se ha expuesto hasta ahora, los métodos de screening son cruciales en la actualidad en diversos campos, entre los que destaca el **ámbito forense** engloba todo aquello que esté relacionado con la justicia, más concretamente, las **ciencias forenses** incluyen diversas disciplinas que tienen como objetivo primordial la aportación de pruebas para poder resolver cuestiones jurídicas.⁶³ Dentro de las ciencias forenses se encuentra la **química forense** que aborda la investigación y el análisis de las pruebas forenses en el laboratorio, la interpretación de los resultados obtenidos y la defensa de las evidencias halladas ante un tribunal.⁶⁴ Para el análisis de las pruebas se utilizan métodos y técnicas de la Química Analítica siendo muchas de ellas métodos de screening. En este ámbito de la química forense, todos los métodos de screening se emplean como pruebas presuntivas,⁶⁵ es decir, aquellos métodos que ofrecen de manera rápida y económica una respuesta inicial al problema establecido. Si

el resultado es positivo, se realizan pruebas confirmatorias que constan de métodos más precisos que suponen una mayor complejidad analítica y, por tanto, un mayor gasto de tiempo y costes más elevados.⁶⁶

En la actualidad, se disponen de métodos químicos para el análisis de drogas, alcohol, sangre, fluidos biológicos, fibras textiles, pinturas, restos de incendios, explosivos, vidrios, suelos, trazas geológicas, documentos, huellas digitales y armas de fuego, entre otros.⁶⁵ A continuación se van a explicar varios de los métodos de screening utilizados como pruebas presuntivas en el ámbito forense para diferentes tipos de muestras.

Con lo que respecta al análisis de **alcohol etílico**, los métodos de screening se emplean, principalmente, en el control de la seguridad vial, ya que los accidentes de tráfico causados por conductores bajo los efectos del alcohol son una de las principales causas de fallecimiento en todo el mundo. Por esta razón, se han diseñado dispositivos que permiten controlar a los Cuerpos de Seguridad el nivel de alcohol ingerido por los conductores, sancionando así, a los que superan el nivel permitido por la ley. Estos dispositivos se denominan etilómetros y miden el nivel de alcohol etílico en aire exhalado. Existen dos grandes categorías dentro de los etilómetros: los de muestreo y los evidenciales. La principal diferencia que existe entre ambos es que los de muestreo no tienen validez legal mientras que los evidenciales sí la tienen, siendo estos últimos más precisos, por tanto, los etilómetros de muestreo solo aportan resultados presuntivos mientras que los evidenciales ofrecen resultados confirmatorios.



Figura 17. Etilómetro de muestreo que permite llevar a cabo una prueba de alcoholemia de manera rápida y precisa.⁶⁸

Una de las técnicas que se emplean en los etilómetros es el uso de sensores ópticos de gas por absorción de radiación infrarroja. El dispositivo se compone de un emisor de radiación IR, una serie de filtros que dejan pasar solamente la radiación de longitud de onda de 9,5 micrómetros, que es en la que absorbe específicamente el etanol en aire, y un detector que recibe la radiación de esa longitud de onda que no ha sido absorbida por el etanol y esta se transforma en una señal eléctrica que se relaciona con la concentración de etanol por medio de la ley de Beer-Lambert. Esta técnica es la misma que se ha visto anteriormente en el ejemplo del sensor de CO₂ para el control de los gases contaminantes y la calidad del aire. Pero esta tecnología supone un alto coste por lo que se ha desarrollado una alternativa que se basa en el uso de una célula electroquímica, también conocida como fuel cell. Consiste en una capa porosa recubierta por ambos lados de platino finamente dividido y sobre ella se impregna una disolución electrolítica de ácido y se conecta un cable de platino. Al introducir el aire espirado en la célula, el etanol se oxida a ácido acético en el ánodo mientras que el oxígeno atmosférico se reduce en el cátodo produciéndose en el proceso dos electrones libres por cada molécula que se oxida de etanol e iones H⁺ que se combinan con el oxígeno para formar agua consumiéndose un electrón por cada ion H⁺. El resultado de esta reacción es la producción de una corriente a través del cable de platino que conecta ambos electrodos y que está conectado a un medidor de corriente eléctrica. La señal eléctrica que se produce es proporcional a la concentración de etanol en el aire exhalado, por tanto, esta técnica se basa en un sensor electroquímico.

Además del análisis de etanol en aire exhalado, también tiene valor legal el análisis en sangre, de hecho, es el método más preciso que existe para medir la concentración de etanol que ha consumido una persona. Este se realiza por cromatografía de gases, pero tiene ciertos inconvenientes ya que es un método invasivo y supone el traslado de la persona al centro de análisis lo que supone un mayor gasto de tiempo, por lo que los métodos de screening son mucho más efectivos para esta situación.⁶⁷

Al igual que se controla el consumo de alcohol en los conductores, también se llevan a cabo análisis de **drogas** in situ. El más extendido es el análisis en saliva en el que se toma la muestra con una varilla colectora que, a veces, va impregnada de compuestos que facilitan la salivación como aromas, ácido cítrico o sacarosa, y se introduce en el aparato que es el que da la respuesta en función del valor de corte que se le haya impuesto. Existen diferentes métodos para llevar a cabo el análisis, entre los que destaca la inmunocromatografía ya que es el que se utiliza en la mayoría de los dispositivos y sigue el mismo principio explicado en el test de embarazo. A veces, también se pueden determinar por reacciones colorimétricas con test kits.

A diferencia de los etilómetros, estos dispositivos tardan entre 10 y 20 minutos en proporcionar la respuesta. Por lo general, determinan la presencia de seis tipos de drogas diferentes las cuales son: anfetaminas, metanfetaminas, opiáceos, cocaína, benzodiacepinas y cannabis.⁶⁹ Si un conductor da positivo en la prueba de drogas en saliva, tiene derecho a pedir el análisis en sangre que es más preciso. Entre los análisis de drogas en sangre destaca el ELISA en el que se utiliza un anticuerpo ligado a la enzima fosfatasa alcalina (ALP) para unirse a los antígenos presentes en las drogas de interés. En el ensayo se añaden alcohol deshidrogenasa (ADH) con etanol como sustrato y diaforasa con INT-violeta (sal de tetrazolio) como sustrato. La ADH produce la desforilación del NADP a NAD activando el ciclo redox de ADH-diaforasa en el que la ADH oxida al etanol reduciendo el NAD a NADH que en presencia de diaforasa reduce el INT-violeta a formazán a la vez que el NADH se oxida a NAD y, puede comenzar de nuevo el ciclo. El formazán producido presenta un color azul muy intenso y es medido por absorción a 492 nm. Al producirse el ciclo repetidas veces se produce una amplificación de la señal, es decir, una mayor formación de formazán lo que supone una mayor facilidad en su medida.⁷⁰



Figura 18. Test de drogas en saliva (fluido bucal) que puede detectar las siguientes sustancias: cocaína, opiáceos, anfetaminas, metanfetaminas/drogas de diseño (por ejemplo, éxtasis, MDMA), benzodiazepinas (por ejemplo, en medicamentos con receta) y cannabis (THC) Cuenta con el colector de muestra de saliva y el aparato donde se lleva a cabo en el ensayo el que cuenta con una pantalla de lectura donde aparecen los resultados.⁷¹

Como se ha visto, la sangre es un fluido biológico en el cual se pueden determinar numerosas sustancias de interés, pero, en algunas ocasiones, lo que interesa determinar es la **presencia de sangre** en vez de buscar analitos en ella. Para ello existen diferentes ensayos test kist colorimétricos que se basan en reacciones redox con aparición de un compuesto coloreado visible, por tanto, se trata de métodos de screening sensoriales.

Una de las técnicas es la denominada técnica de Bencidina o Adler consiste en aprovechar la acción peroxidasa del grupo hemo de la hemoglobina, presente en la sangre, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno oxidando a la bencidina en un compuesto con una tonalidad azul intensa visible, por tanto, si hay presencia de sangre al añadir los reactivos tornará en un color azul. El inconveniente de esta técnica es los falsos positivos en presencia de otras sustancias oxidantes o con acción similar a las peroxidasa.⁷²

Otra técnica muy conocida para la detección de sangre es la técnica del luminol, que se basa, al igual que la de la de Adler, en la oxidación del luminol por la acción peroxidasa de la hemoglobina presente en la sangre en medio alcalino, para conseguirlo se suele usar carbonato de sodio. El hierro de la propia sangre actúa como catalizador en la reacción. En el proceso de oxidación el luminol pasa por un intermedio de reacción inestable de mayor energía que el luminol no excitado, por lo que emite quimioluminiscencia en forma de luz visible de color azul.^{73,74}

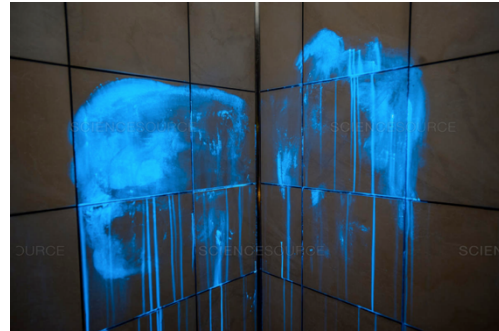


Figura 19. Sangre detectada con la técnica del luminol.⁷⁵

Además de la sangre, en ocasiones, como es el caso de las violaciones sexuales u otros crímenes de índole sexual, la determinación de otros fluidos corporales como fluido seminal o vaginal es de gran importancia. A continuación, se van a exponer diferentes métodos para la detección de **semen**. El método más sencillo es la utilización de la lámpara de Wood que consiste en la aplicación de luz ultravioleta sobre las superficies en las que se sospeche que hay restos de semen, ya que este fluido biológico emite fluorescencia en el rango de longitudes de onda de 350 a 500 nm, pero esta prueba no es precisa ya que otra clase de fluidos pueden también presentar fluorescencia en ese rango de longitudes de onda, por tanto, es simplemente una prueba presuntiva, sin carácter legal.



Figura 20. En la imagen de la izquierda se aprecia una muestra sobre la que se sospecha que hay líquido seminal. En la imagen de la derecha se observa la misma muestra a la que se le ha aplicado luz UV, es decir, se ha utilizado la lámpara de Wood, pudiéndose apreciar claramente la mancha de semen la cual adopta un color blanquecino.⁷⁶

Otra prueba presuntiva más precisa es la identificación de la fosfatasa ácida es un indicador de la presencia de semen, ya que es una enzima que se localiza en el tejido prostático, del bazo, del hígado o del riñón y, por tanto, el único líquido a través del cual se puede dispersar es el semen. Consiste en presionar sobre la superficie en la que se sospecha que hay restos de semen, un papel húmedo absorbente para que, de esta forma, la fosfatasa ácida que es muy soluble en agua, quede rápidamente absorbida en el papel. La fosfatasa en medio ácido cataliza la hidrólisis del alfa-naftil fosfato produciendo alfa-naftol que reacciona con una sal de diazonio formando un compuesto de color púrpura. Por tanto, se trata de un test kit colorimétrico y la lectura de la respuesta se realiza de forma sensorial observando el color del compuesto formado. Como ya se ha nombrado, esta técnica de la fosfatasa ácida es utilizada como prueba presuntiva, la prueba confirmatoria que se emplea es la

identificación del antígeno prostático específico (PSA), conocido como antígeno p30 mediante el test ELISA.⁷⁷



Figura 21. Detección de fluido seminal mediante la prueba presuntiva de la identificación de la fosfatasa. En este caso, se ha aplicado sobre una prenda de ropa de la víctima de una posible agresión sexual. En la imagen A, se observa una mancha blanquecina que es sobre la que se va a aplicar el papel absorbente. En la imagen B, aparece el papel que hay que presionar sobre la mancha para llevar a cabo la prueba. En la imagen C, el papel ha tornado de color de azul a púrpura una vez que se ha presionado sobre la mancha, lo que indica un resultado positivo que supone la presencia de semen.⁷⁸

Para finalizar, se va a tratar el screening para la detección **explosivos** ya que, es de vital importancia, para evitar que las amenazas de ataques terroristas con artefactos explosivos se lleven a cabo poniendo en riesgo la seguridad de los ciudadanos. La mayoría de los artefactos están compuestos de nitroderivados ya que son altamente explosivos produciendo fuertes reacciones exotérmicas, entre los más utilizados están el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), el 2,4-dinitrotolueno (DNT), la 1,3,5-trinitroperhidro-1,3,5-triazina (RDX) y el tetranitrato de pentaeritrol (PETN). Además de ser explosivos, los residuos de estos compuestos son contaminantes por lo que su detección también tiene aplicación en la protección medioambiental. Estos nitroderivados explosivos son muy sensibles al impacto, al choque y a la fricción por lo que conviene aplicar un método en el que no haya que manipular el compuesto explosivo, por tanto, la detección de sus vapores es una excelente manera de conseguirlo, aunque presenta el inconveniente de que son poco volátiles a temperatura ambiente, además, suelen ir empaquetados por lo que todavía resulta más complicado que sus vapores salgan al exterior, por esta razón, es de gran importancia que los métodos utilizados en la detección de estos compuestos sean muy sensibles. Además de una buena sensibilidad, estos métodos tienen que ser específicos ya que determinados contaminantes medioambientales pueden dar lugar a falsos positivos. Teniendo en cuenta estas propiedades, una de las opciones más empleadas en este campo es el uso de sensores ópticos ya que ofrecen una buena sensibilidad y especificidad, tienen un coste bajo, son rápidos y permiten fabricar dispositivos portátiles. Es decir, la absorbancia y la fluorescencia son los principios por los que se rigen estos sensores, aunque esta última es la más utilizada ya que presenta una mayor sensibilidad en uno a tres órdenes de magnitud y un mayor rango lineal con respecto a la absorbancia.

Los nitroderivados son compuestos deficientes en electrones ya que el grupo nitro retira densidad electrónica, por lo que pueden interaccionar con compuestos ricos en electrones que presenten propiedades fluorescentes, es decir, compuestos fluoróforos disminuyendo así la fluorescencia de estos. Este proceso de desactivación de la fluorescencia se denomina quenching de fluorescencia y se puede llevar a cabo a través de colisiones moleculares, lo que se denomina apagado dinámico, o por la formación de complejos siendo un apagado estático. Por tanto, si hay presencia de explosivo el sensor disminuirá su fluorescencia, pudiéndose apreciar de manera visual de una manera rápida.

Se han desarrollado diversos materiales fluoróforos, por ejemplo, los polímeros conjugados tanto orgánicos como inorgánicos, aunque no son una opción muy viable ya que su síntesis es un proceso complejo y requiere mucho tiempo, además, resultan contaminantes para el medioambiente. Por esto, han surgido nuevos materiales fluoróforos como partículas pequeñas, sistemas supramoleculares o materiales biológicos como proteínas fluorescentes.

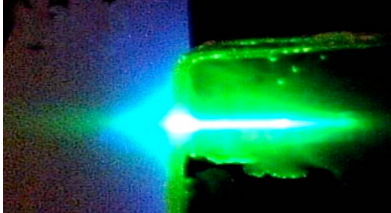


Figura 22. Sensor óptico compuesto por un polímero orgánico semiconductor que cuando está en presencia de TNT se desactiva su fluorescencia pudiéndose observar, es decir, mediante un screening sensorial.⁷⁹

Existen otros métodos para la detección de explosivos como, por ejemplo, métodos electroquímicos, cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS) o espectrometría de movilidad iónica (IMS), pero no pertenecen a los métodos de screening ya que requieren protocolos complejos y procesos de calibración que suponen mayor gasto de tiempo y dinero, aunque, en los últimos años, se han desarrollado dispositivos portátiles con estas técnicas que se acaban de mencionar, por lo que, en ese caso, sí que se podrían considerar métodos de screening.⁸⁰

7) CONCLUSIONES

Tras realizar la búsqueda bibliográfica en diferentes fuentes contrastadas sobre los métodos de screening y sus aplicaciones en el ámbito forense, se puede concluir lo siguiente:

1. Los métodos de screening tienen una gran importancia hoy en día debido a que proporcionan la información necesaria a los problemas analíticos que se plantean, de manera rápida, sencilla y económica.
2. Cuando se va a seleccionar un método de screening para solventar un determinado problema analítico, es necesario tener en cuenta las propiedades analíticas del método, como la sensibilidad, la especificidad y la región de no-fiabilidad entre otras, ya que son las que van a determinar si el método es adecuado o no para esa aplicación concreta, además, es muy importante que sean métodos validados y verificados para el aseguramiento de resultados confiables con un alto grado de fiabilidad.
3. Existen numerosos campos en los que se emplean los métodos de screening tales como el ámbito medioambiental, farmacéutico, la industria alimentaria, destacando la aplicación en medicina ya que permiten la detección precoz de muchas enfermedades.
4. En el ámbito forense, los métodos de screening tienen un papel fundamental ya que, en muchas ocasiones, se necesitan resultados inmediatos y estos métodos proporcionan esa rapidez. La aplicación más obvia es en las que el resultado de la prueba tiene que obtenerse en el instante en el que se realiza, es la detección de alcohol y drogas en los controles de seguridad vial, ya que en función del resultado obtenido se procede a la inmovilización del vehículo en ese mismo instante. Además, también se emplean en la detección de fluidos biológicos como sangre y semen en situaciones de violación sexual o agresión, y en la detección de otras sustancias que puedan poner en peligro la seguridad ciudadana como son los explosivos, evitando posibles amenazas terroristas. La aportación de los resultados obtenidos a través de estos métodos de screening permite resolver cuestiones de índole jurídico, además de evitar que sucedan otros delitos.

8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Analytical Features in Qualitative Analysis. *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 477-487.
2. Valcárcel, M. et al. Principles of Qualitative Analysis in the Chromatographic Context. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1158*, 234-240.
3. Danzer, K. Theoretical and Metrological Fundamentals. En *Analytical Chemistry*; Springer: Germany, 1947.
4. Valcárcel, M. *Analytical Chemistry Today and Tomorrow*; IntechOpen: Rijeka, 2012; pp 93-114.
5. Ríos, A.; Téllez, H. Reliability of Binary Analytical Responses. *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 509-515.
6. Muñoz-Olivas, R. Screening Analysis: An Overview of Methods Applied to Environmental, Clinical and Food Analyses. *Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 203-216.
7. Valcárcel, M.; Cárdenas, M^a. S. *Automatización y Miniaturización en Química Analítica*; Springer: Barcelona, 2000; pp 1-30.
8. Soriano, M. L.; Zougagh, M.; Ríos, Á; Valcárcel, M. Analytical Reliability of Simple, Rapid, Minuturized, Direct Analytical Processes: A call to arms. *Trends Anal. Chem.* **2019**, *114*, 98-107.
9. Pulido, A.; Ruisánchez, I.; Boqué, R.; Rius, F. X. Estimating the Uncertainty of Binary Test Results to Assess their Compliance with Regulatory Limits. *Trends Anal. Chem.* **2002**, *455*, 267-275.
10. Valcárcel, M.; Cárdenas, S.; Gallego, M. Sample Screening Systems in Analytical Chemistry. *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 685-694.
11. Viñes, J.J. La Efectividad de la Detección Precoz de las Enfermedades. *An. Sist. Sanit. Navar.* **2007**, *30 (1)*, 11-27.
12. Duarte, R. et al. *A Screening Method for Ranking Chemicals by their Fate and Behaviour in the Environment and Potential Toxic Effects in Humans Following Non-occupational Exposure*; Technical Report: MCR Institute for Environment and Health, UK, abril de 2004.
13. Colomé, E.; Iñarra, Ú. Perspectivas de Futuro en el Diseño y el Desarrollo de un Fármaco. *Piel.* **2008**, *23*, 49-51.
14. García-Rodríguez; S.; Giménez; M.P. Recursos Humanos e Instrumentales en un Laboratorio Toxicológico Forense. *Revista de Toxicología* **2005**, *22 (1)*, 1-11.
15. Plaza, M. Validación de un Método Cualitativo de Screening de Muestras para el Análisis Microbiológico de Cosméticos Empleando Citometría de Flujo con Detección Fluorimétrica. Tesis doctoral, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, junio de 2016.
16. Trullols, E.; Ruisánchez, I.; Rius, F. X. Validation of Qualitative Analytical Methods. *Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 137-145.
17. Simonet, B. et al. Unreliability of Screening Methods. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *516*, 67-74.
18. Merk Millipore. http://www.merckmillipore.com/ES/es/product/pH-indicator-strips-pH-0-14-Universal-indicator,MDA_CHEM-109535 (consultada 3 julio 2019).
19. Eremin, S. A.; Laassis, B.; Aaron, J. Photochemical-fluorimetric Method for the Determination of Total Chlorophenoxyacid Herbicides. *Talanta* **1996**, *43*, 295-301.

20. Bayán, J.; Silva, Y. Nuevas Alternativas en Química Clínica: Análisis en "Slide" Secos o Química en Fase Sólida -Dry Slide Technology-. *Laboratorio Actual* **1996**, *28*, 17-20.
21. Ortho Clinical Diagnostics. <https://www.orthoclinicaldiagnostics.com/en-us/home/solutions-products/advancing-dry-technologies> (consultada 3 julio 2019).
22. Grenner, G. et al. Multilayer Fluorescent Immunoassay Technique. *Clin.Chem.* **1989**, *35*, 1865-1868.
23. Cano, C. Tiras Reactivas Ópticas para la Determinación de Metales Pesados. Tesis doctoral, Universidad de Granada, Granada, 2005.
24. Lidertest. <https://lidertest.com/guias-de-uso/uso-del-test-de-embarazo/> (consultada 4 julio 2019).
25. Monlab. <http://www.monlab.es/index.php/productos-monlab/pruebas-rapidas/muestras-orinas/pruebas-embarazo.html> (consultada 13 julio 2016).
26. Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Biosensors and Bioelectronics* **2001**, *16*, 121-131.
27. Escalona, L. et al. Los Sensores Químicos y su Utilidad en el Control de Gases Contaminantes. *Revista Ingeniería UC* **2012**, *19*, 74-88.
28. RobotShop. <https://www.robotshop.com/us/es/sensor-co2-infrarrojo-analogico-gravity-para-arduino.html> (consultada 24 julio 2019).
29. Dräger. https://www.draeger.com/es_es/Applications/Products/Mobile-Gas-Detection/Draeger-Tubes-and-CMS/Draeger-Tubes/Short-term-Tubes (consultada 26 julio 2019).
30. Aquiles, P. Evaluación de la Calidad del Aire Referente a Emisiones de Gases de Combustión: Monóxido de Carbono (CO) Dióxido de Azufre (SO₂) y Dióxido de Nitrógeno (NO₂) Generados por los Vehículos que Transitan en el Sector de Durán. Trabajo de Titulación Examen Complexivo. Universidad de Guayaquil, Guayaquil, febrero de 2016.
31. Unger-Heumann, M. Strategy of Analytical Test Kits. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1996**, *354*, 803-806.
32. Macherey-Nagel. <https://www.mn-net.com/tabid/4648/Default.aspx> (consultada 30 julio 2019).
33. Vázquez-Taset, Y. M.; De Miguel-Fernández, C. Origen de los nitratos (NO₃) y nitritos (NO₂) y su influencia en la potabilidad de las aguas subterráneas. *Minería y Geología* **2006**, *22* (nº3), 1-9.
34. Rodríguez Chávez, L. Á. et al. Metahemoglobinemia súbita. *Med. Clín. Prác.* **2019**.
35. R-Biopharm AG. <https://food.r-biopharm.com/technologies/enzymatic-assays/> (consultada 31 julio 2019).
36. *ELISA Handbook*. Boster Biological Technology: Pleasanton, CA.
37. Hnasko, R. et al. A Rapid Method to Improve Protein Detection by Indirect ELISA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *410*, 726-731.
38. Bertha, G. Antígenos e Inmunógenos. *Rev. Fac. Med. UNAM* **2009**, *52*, 41-42.
39. Schultz, J.; Petersen, K. Antibody-Based Techniques to Distinguish Proteins and Identify Sturgeon Glue in Works of Art. Conference Paper. Proceeding of Symposium 2011: Adhesives and Consolidants for Conservation: Research and Applications, Ottawa, Ontario, Canada.

40. Ochoa, R. F. *Técnicas Inmunoenzimáticas Para Eensayos Clínicos De Vacunas y Estudios Inmunoepidemiológicos*; Finlay Ediciones: La Habana, 2012.
41. Kuby, J. et al. Antigen-antibody Interactions: Principles and Applications. En *Kuby Immunology*, 6th ed.; McGraw-Hill: México, D. F., 2007; pp 137-159.
42. Heiat, M. et al. Classical and Modern Approaches Used for Viral Hepatitis Diagnosis. *Hepat. Mon.* **2014**, *14*, e17632.
43. Sigifredo Ospina O. Diagnóstico de la Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. *Infectio* **2006**, *10*, 273-278.
44. Álvarez Estévez, M. et al. Diagnóstico Microbiológico de la Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2014**, *33*, e44-e52.
45. Lamotte Castillo, J. A. Infección por VIH/Sida en el Mundo Actual. *Medisan* **2014**, *18*, 117-138.
46. Maroto, A. et al. Incertidumbre y Precisión. *Técnicas de laboratorio* **2001**, *266*, 834-837.
47. Gella, J. Trazabilidad e Incertidumbre en la Medición en el Laboratorio Clínico. *6º Ciclo Internacional de Conferencias de la Calidad IFCC-BIO RAD*: México D. C., junio de 2012.
48. Ellison, S. L. R.; Fearn, T. Characterising the Performance of Qualitative Analytical Methods: Statistics and terminology. *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 468-476.
49. Ellison, S. Uncertainties in Qualitative Testing and Analysis. *Accred. Qual. Assur.* **2000**, *5*, 346-348.
50. Valcárcel, M. et al. Selectivity in Analytical Chemistry Revisited. *Trends Anal. Chem.* **2001**, *20*, 386-393.
51. Ruisánchez I. et al. Validación de Métodos Analíticos Cualitativos. *Técnicas de Laboratorio*, **2003**, *81*, 328-335.
52. Brambila, E. Validación y Verificación de Sistemas de Medición en el Laboratorio Clínico. *6º Ciclo Internacional de Conferencias de la Calidad IFCC-BIO RAD*: México D. C., junio de 2012.
53. ISO 8402: Quality Management and Quality Assurance – Vocabulary, 1994.
54. ISO/IEC 17025: General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, 2017.
55. Pulido, A. et al. Uncertainty of Results in Routine Qualitative Analysis. *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 647-654.
56. De Rubis, G. et al. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. *Trends in Pharmacol. Sci.* **2019**, *40*, 172-186.
57. Wills, B. et al. Role of Liquid Biopsies in Colorectal Cancer. *Curr. Probl. Cancer* **2018**, *42*, 593-600.
58. Din, F. V.; Dunlop, M. G. Colorectal Cancer: Management. *Medicine* **2019**, *47*, 405-409.
59. Normanno, N. et al. The Liquid Biopsy in the Management of Colorectal Cancer Patients: Current Applications and Future Scenarios. *Cancer Treat. Rev.* **2018**, *70*, 1-8.
60. Montminy, E. M. et al. Progress of Colorectal Cancer Screening in United States: Past Achievements and Future Challenges. *Prev. Med.* **2019**, *120*, 78-84.

61. Songster, C. L. et al. Immunochemical Detection of Fecal Occult Blood. The Fecal Smear Punch-disc Test: A New Non-invasive Screening Test for Colorectal Cancer. *Cancer* **1980**, *45*, 1099-1102.
62. Simon, J. B. Occult Blood Screening for Colorectal Carcinoma: A Critical Review. *Gastroenterology* **1985**, *88*, 820-837.
63. Jara-Negrete, E. El Valor de la Química Forense en la Investigación Criminal. *Rev. Ecuat. Med. Cienc. Biol.* **2015**, *36*, 25-31.
64. Báez, M.E.; Valdebenito, G. *Química Forense: Química Analítica Aplicada a la Criminología*. Universidad de Chile.
65. Blackwell, W. *Forensic Chemistry Fundamentals and Applications*. Siegel J.A.: USA, 2016.
66. Matamoros, M.; Villanueva, J. Ciencias Forenses y Pruebas Presuntivas. *Rev. cienc. forenses Honduras*. **2016**, *2*, 45-54.
67. De Prada, F.I.; Martínez, J.A. Alcohol y Alcoholímetros. Historia, Fundamentos Científicos y Aplicación Didáctica. *An. R. Soc. Esp. Quím.* **2003**, *53*.
68. Dräger. https://www.draeger.com/es_es/Water-Treatment/Products/Breath-Alcohol-and-Drug-Testing/Alcohol-Screening-Devices/Draeger-Alcotest-5820 (consultada 5 agosto 2019).
69. DRUID, Analytical Evaluation of Oral Fluid Screening Devices and Preceding Selection Procedures; 6th Framework Program; D 3.2.2, 2010.
70. Aoki, K. et al. Forensic Immunochemistry. *Forensic Sci. Int.* **1996**, *80*, 163-173.
71. Dräger. https://www.draeger.com/es_es/Applications/Products/Breath-Alcohol-and-Drug-Testing/Drug-Testing-Devices/DrugCheck-3000 (consultada 18 agosto 2019).
72. Giovanni, E. Técnicas Colorimétricas. *Visión Criminológica-Criminalística*. **2017**, 18-23.
73. Hayashi, S. et al. Acceleration effect of the forensic luminol reaction induced by visible light irradiation of whole human blood aqueous solutions. *Forensic Sci. Int.* **2019**, *299*, 208-214.
74. Barni, F. et al. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta* **2007**, *72*, 896-913.
75. Science Source Images. <https://www.sciencesource.com/archive/Luminol-Used-To-Detect-Blood-2013-SS2771768.html> (consultada 20 agosto 2019).
76. Criminalística (República Bolivariana de Venezuela). <http://criminalistica.mp.gob.ve/experticia-seminal/> (consultada 11/09/2019)
77. Mayoral-Andrade, G. et al. Identificación forense de fluido seminal. *Lab. Acta.* **2006**, *18*, 43-46.
78. Quispe-Mayta, S. E. et al. Pesquisa del Fluido Seminal en Víctimas de Violencia Sexual por el Laboratorio Forense. *Rev. Méd. La Paz* **2009**, *15*, 11-18.
79. Massachusetts Institute of Technology. <http://news.mit.edu/2005/sensing> (consultada 7 septiembre 2019).
80. Xiangcheng, S. et al. Fluorescence based Explosives Detection: From Mechanisms to Sensory Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 1-43.