



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ESPECTROSCOPIA
INFRARROJA PARA LA DETERMINACIÓN DE *Cannabis sativa*
EN MUESTRAS INCAUTADAS QUE INGRESAN AL
LABORATORIO DE QUÍMICA FORENSE DEL DEPARTAMENTO
DE CRIMINALÍSTICA DE CHIMBORAZO”**

TESIS DE GRADO

Previo a la Obtención del Título

BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA

AUTOR

SÁNCHEZ ORDOÑEZ GABRIELA ELIZABETH

RIOBAMBA – ECUADOR

2015



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ESPECTROSCOPIA
INFRARROJA PARA LA DETERMINACIÓN DE *Cannabis sativa*
EN MUESTRAS INCAUTADAS QUE INGRESAN AL
LABORATORIO DE QUÍMICA FORENSE DEL DEPARTAMENTO
DE CRIMINALÍSTICA DE CHIMBORAZO”**

TESIS DE GRADO
Previo a la Obtención del Título
BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA

AUTOR: SÁNCHEZ ORDOÑEZ GABRIELA ELIZABETH
TUTOR: DR. CARLOS PILAMUNGA

RIOBAMBA – ECUADOR

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal de tesis certifica que: El trabajo de investigación “VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA PARA LA DETERMINACIÓN DE *Cannabis sativa* EN MUESTRAS INCAUTADAS QUE INGRESAN AL LABORATORIO DE QUÍMICA FORENSE DEL DEPARTAMENTO DE CRIMINALÍSTICA DE CHIMBORAZO” de responsabilidad de la señorita egresada Gabriela Elizabeth Sánchez Ordoñez, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dra. Cecilia Veloz DECANA FAC. DE CIENCIAS
Dra. Ana Albuja DIRECTORA ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA
Dr. Carlos Pilamunga DIRECTOR DE TESIS
BQF. Víctor Guangasig MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Lcda. Karen Acosta MIEMBRO DEL TRIBUNAL
COORDINADOR SISBIB ESPOCH Nota de Tesis Escrita

HOJA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Gabriela Elizabeth Sánchez Ordoñez**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

Gabriela Elizabeth Sánchez Ordoñez

DEDICATORIA

A Dios por ser la guía en mi camino para culminar esta etapa importante de mi vida.

A mis padres Rosa y César pilares fundamentales en mi vida, ya que gracias a su apoyo incondicional en la toma de decisiones importantes me ayudaron a ser la persona que soy.

A esas personas con las que compartimos muchos momentos gratos y que en situaciones difíciles extendieron su mano para darnos apoyo y juntos salir adelante, AMIGOS y AMIGAS, Alberto gracias.

Gabriela Elizabeth Sánchez Ordoñez

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por la formación académica que me ha brindado.

Al Departamento de Criminalística de Chimborazo por permitirme llevar a cabo mi investigación y de manera especial al Dr. Wilson Moncayo M. por la orientación en la realización experimental de mi trabajo.

Al Dr. Carlos Pilamunga por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente Tesis.

Al BQF. Víctor Guangasig Miembro del Tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.

Gabriela Elizabeth Sánchez Ordoñez

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	viii
SUMMARY	ix

CAPÍTULO I

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Situación Problemática	1
1.2	Formulación del Problema	2
1.3	Justificación teórica	2
1.4	Justificación práctica	3
1.5	Objetivos	3
1.5.1	<i>Objetivo general</i>	3
1.5.2	<i>Objetivos específicos</i>	3

CAPÍTULO II

2	MARCO TEÓRICO	4
2.1	Marco Filosófico o epistemológico de la investigación	4
2.2	Antecedentes de investigación	5
2.3	Bases Teóricas	8
2.3.1	<i>Validación</i>	8
2.3.1.1	<i>La validación como requisito de la norma COVENIN 2534:2000</i>	8
2.3.1.2	<i>Tipos de validación</i>	9
2.3.1.2.1	<i>Validación retrospectiva</i>	9
2.3.1.2.2	<i>Validación prospectiva</i>	10
2.3.1.3	<i>Validación del método</i>	10
2.3.1.4	<i>Parámetros para la validación</i>	11
2.3.1.4.1	<i>Especificidad (selectividad)</i>	11
2.3.1.4.2	<i>Límite de detección</i>	11
2.3.1.4.3	<i>Precisión (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad)</i>	11
2.3.1.4.4	<i>Estabilidad</i>	12
2.3.2	<i>Espectrometría Infrarroja</i>	12

2.3.2.1	<i>Aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo</i>	13
2.3.2.2	<i>Espectrometría de absorción en el infrarrojo medio</i>	14
2.3.2.2.1	<i>Manipulación de la muestra</i>	14
2.3.2.3	<i>Análisis cualitativo</i>	15
2.3.2.3.1	<i>Frecuencias de grupo</i>	15
2.3.2.3.2	<i>Región de la huella dactilar</i>	15
2.3.2.3.3	<i>Espectros de componentes forenses importantes</i>	16
2.3.2.4	<i>Instrumentos para el infrarrojo</i>	19
2.3.2.4.1	<i>Espectrómetros de transformada de Fourier</i>	19
2.3.2.4.2	<i>Diseños de instrumentos</i>	20
2.3.2.4.3	<i>Instrumentos dispersivos</i>	22
2.3.2.4.4	<i>Instrumentos no dispersivos</i>	22
2.3.3	<i>Cannabis sativa</i>	22
2.3.3.1	<i>Química</i>	23
2.3.3.2	<i>Farmacocinética</i>	24
2.3.3.3	<i>Distribución de Δ^9-THC en las plantas y los productos del Cannabis</i>	25
2.3.3.4	<i>Biosíntesis</i>	25
2.3.3.5	<i>Productos del cannabis</i>	25
2.3.3.5.1	<i>Hierba de cannabis</i>	25
2.3.3.6	<i>Componentes químicos de importancia forense</i>	27

CAPITULO III

3	METODOLOGÍA	29
3.1	Diseño experimental	29
3.1.1	<i>Características del diseño experimental</i>	29
3.1.2	<i>Factores de estudio</i>	29
3.1.3	<i>Manejo específico del experimento</i>	30
3.1.3.1	<i>Lugar y Pruebas de ensayo</i>	30
3.2	Protocolo	30
3.2.1	<i>Cadena de custodia</i>	30
3.2.2	<i>Técnicas para el análisis de Cannabis sativa</i>	32
3.3	Técnica para la validación del método de análisis	38
3.3.1	<i>Especificidad</i>	38
3.3.1.1	<i>Procedimiento</i>	38
3.3.2	<i>Límite de detección</i>	38

3.3.2.1	<i>Procedimiento</i>	38
3.3.3	<i>Precisión del método</i>	39
3.3.3.1	<i>Procedimiento</i>	39
3.3.4	<i>Estabilidad</i>	39
3.3.4.1	<i>Procedimiento</i>	39

CAPITULO IV

4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1	Análisis, interpretación y discusión de resultados	40
4.1.1	<i>Muestras analizadas período Septiembre 2014 – Enero 2015</i>	40
4.1.2	<i>Pruebas presuntivas</i>	41
4.1.3	<i>Pruebas confirmatorias</i>	42
4.2	Pruebas de hipótesis	43
4.2.1	<i>Parámetros de Validación</i>	43
4.2.1.1	<i>Especificidad</i>	43
4.2.1.2	<i>Límite de detección</i>	45
4.2.1.3	<i>Precisión</i>	47
4.2.1.4	<i>Estabilidad</i>	49
4.3	Presentación de resultados	51
	CONCLUSIONES	52
	RECOMENDACIONES	53
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1-2.	Regiones del espectro infrarrojo	13
Cuadro 2-2.	Principales aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo	13
Cuadro 3-2.	Frecuencias de grupo para grupos orgánicos funcionales	15
Cuadro 4-2.	Distribución de THC	25
Cuadro 5-2.	Componentes químicos de la marihuana	27
Cuadro 1-4.	Análisis de muestras por el ensayo de cromatografía en capa fina	42
Cuadro 2-4.	Análisis de la Especificidad del método frente a los parámetros evaluados	44
Cuadro 3-4.	Análisis del Límite de detección	45
Cuadro 4-4.	Análisis de la Precisión del método (repetibilidad): Absorbancias a (1500-1600cm ⁻¹)	48
Cuadro 5-4.	Análisis de la Estabilidad	50
Cuadro 6-4	Análisis de resultados de los parámetros de pruebas de hipótesis	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2.	Frecuencias de grupo para Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	16
Tabla 2-2.	Frecuencias de grupo para Cannabidiol	17
Tabla 3-2.	Frecuencias de grupo para Cannabinol	18
Tabla 1-3.	Ensayos presuntivos para <i>Cannabis sativa</i>	32
Tabla 2-3.	Ensayos confirmatorios para <i>Cannabis sativa</i>	35
Tabla 1-4.	Muestras de marihuana que ingresaron al Laboratorio de Química Forense durante el período Septiembre 2014 - Enero 2015	40
Tabla 2-4.	Resultados Positivos y Negativos en el período Septiembre 2014 – Enero 2015	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2.	Espectro característico del Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	16
Figura 2-2.	Espectro característico del Cannabidiol	17
Figura 3-2.	Espectro característico del Cannabinol	18
Figura 4-2.	Espectrómetro sencillo IR de transformada de Fourier	19
Figura 5-2.	Espectrómetro de un solo haz de IR de transformada de Fourier	20
Figura 6-2.	Espectrómetro de IR de transformada de Fourier de doble haz	21
Figura 7-2.	Aspectos morfológicos de la marihuana	23

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-4.	Muestras de marihuana que ingresaron al Laboratorio de Química Forense durante el período Septiembre 2014 - Enero 2015	40
Gráfico 2-4.	Resultados Positivos y Negativos en el período Septiembre 2014 – Enero 2015	41
Gráfico 3-4	Espectro de análisis de especificidad frente a los solventes utilizados, frente a la muestra testigo reactivo y frente al estándar.	43
Gráfico 4-4.	Espectro de análisis de especificidad frente a degradación por temperatura	43
Gráfico 5-4.	Espectro de análisis del límite de detección	45
Gráfico 6-4.	Curva de calibración entre las absorbancias y la concentración de cada una de las diluciones	46
Gráfico 7-4.	Espectro de análisis de la precisión del método	47
Gráfico 8-4.	Espectro de la estabilidad frente a la obscuridad	49
Gráfico 9-4.	Espectro de la estabilidad frente a la luz	49
Gráfico 10-4.	Espectro de la estabilidad frente a temperatura ambiente	50

RESUMEN

Se validó el método analítico usado en la determinación de *Cannabis sativa* que ingresó al Laboratorio de Química Forense de la Provincia de Chimborazo en el período Septiembre 2014 - Enero 2015, empleando ensayos presuntivos como pruebas colorimétricas: Duquenois - Levine y Sal de azul sólido B dando positivo para *Cannabis sativa* mediante el cambio de color. Además la presencia de tricomas cistolíticos tras la observación microscópica. Se aplicaron también ensayos confirmatorios como Cromatografía en Capa Fina que reveló la presencia de manchas en las zonas donde se encuentran los cannabinoides. Asimismo la técnica de Espectroscopia Infrarroja, con el fin de hacer una valoración del método, por lo cual se analizaron varios parámetros establecidos por la Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, como el Límite de detección, obteniéndose 8.64mg/L de concentración del analito que puede detectar el equipo, para la Precisión del método en condiciones de repetibilidad, se obtuvo una desviación estándar relativa de 4.40% por debajo del límite de 5% permitido. En la determinación de Especificidad, los espectros de las muestras no presentan interferencias con el pico característico de los cannabinoides. También se valoró la Estabilidad del método, las muestras sometidas a diferentes condiciones de almacenamiento no se interponen con los picos propios para cannabinoides. En conclusión se comprobó que el equipo infrarrojo cumple con los requerimientos para los que fue diseñado, sabiendo que los parámetros de desempeño del método proporcionarán un alto grado de confianza y seguridad de los resultados, garantizando informes periciales de excelente calidad como respaldo para impartir justicia. Se recomienda hacer la verificación del método en la identificación cualitativa de grupos delta-9-tetrahydrocannabinol por Espectroscopia Infrarroja de transformada de Fourier.

Palabras clave: <MARIHUANA> <CANNABINOIDES> <VALIDACIÓN>
<VERIFICACIÓN> <CONTROL DE CALIDAD> <ESPECTROSCOPIA INFRARROJA>
<ESPECTROS> <REPETIBILIDAD> <CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA>
<TRICOMAS>

SUMMARY

The analytical method was validated in the determining of *Cannabis sativa* which entered to the Forensic Chemistry laboratory in the Chimborazo province from September 2014 to January 2015, using presumptive tests as colorimetric tests: Duquenois - Levine and Salt solid blue B testing positive for *Cannabis sativa* by changing color. Also it found the presence of trichomes after the microscopic observation. Confirmatory tests were also applied as chromatography in thin layer which revealed the presence of spots in cannabinoids areas. Furthermore Infrared Spectroscopy technique in order to make an assessment of the method by which some parameters set by the United Nations Office on Drugs and Crime were analyzed,, as the detection limit, obtaining 8.64mg / L of analyte concentration that can detect the equipment to the accuracy of the method under repeatability conditions, was obtained a relative standard deviation of 4.40% below the allowable limit of 5% . In the determination of specificity the spectra of the samples do not show interference with the characteristic peak of cannabinoids. The stability of the method was also evaluated; the samples subjected to different storage conditions do not stand with their own peak to cannabinoids. In conclusion it was found that the infrared equipment complies with the requirements for which it was designed, knowing that the performance parameters of the method provide a high degree of trust and confidence of results, ensuring expert reports of excellent quality as a support to provide justice. It is recommended to verify the data approach in the qualitative identification of delta-9-tetrahydrocannabinol groups by Infrared Spectroscopy Fourier transform.

Key words: <CANNABIS> <CANNABINOIDS> <VALIDATION> < VERIFICATION >
<QUALITY CONTROL> <INFRARED SPECTROSCOPY> <SPECTRA>
<REPEATABILITY> <CHROMATOGRAPHY IN THIN LAYER > <TRICHOMES>

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Problemática

En la actualidad se desarrollan un sin número de técnicas con el objetivo de recaudar información adecuada de la sustancia a analizar, estos análisis cada vez demandan un mayor porcentaje de confianza en sus resultados.

El costo para realizar estas mediciones generalmente es muy elevado y se pueden generar ciertas variantes que permitan costos adicionales en cuanto a la toma de decisiones basadas en los resultados. Por ejemplo, en un alimento al realizar las diferentes pruebas que muestren que este no es adecuado para el consumo humano, las mismas pueden terminar en demandas por compensación; en drogas prohibidas cuyas resultados confirmen su presencia podrían ocasionar multas además de encarcelamiento y peor aún la ejecución en algunos países. Es por esta razón que es de suma importancia dar un resultado correcto y ser capaz de demostrar lo que en verdad es.

El resultado de una determinada prueba puede tener poco valor si ésta no es confiable y por lo tanto su análisis no debió efectuarse de ese modo. Si un “cliente” solicita se realice un test a un laboratorio, este debe tener un conocimiento a un nivel superlativo, que el cliente no posee. Lo que busca el cliente es confiar en los resultados obtenidos por parte del laboratorio. De esta manera, el laboratorio debe entregar los resultados que han demostrado ser “adecuados para el uso previsto” y así corresponder a la confianza del cliente.

En la literatura científica podemos encontrar información relacionada con los métodos de validación, principalmente acerca de métodos específicos de análisis y medición, sin embargo, estos no son manejados adecuadamente. La mayoría de analistas no desarrollan protocolos internos de validación ya que ven a este proceso como algo que solo puede hacerse de manera externa al laboratorio.

La validación del método es fundamental debido a que, a través de este proceso podemos conocer los parámetros de desempeño del método que proporcionarán un alto grado de

confianza y seguridad de los resultados que se obtienen, además con este proceso los laboratorios podrán conseguir acreditarse y ser reconocidos como competentes demostrando que operan con un sistema de calidad, tienen competencia técnica del tipo de ensayo y/o calibración que realizan y generan resultados técnicamente válidos.

1.2 Formulación del Problema

Un laboratorio de análisis debe asegurar la obtención de resultados altamente confiables. Si las medidas que se realizan en el ámbito de análisis no están respaldadas por un adecuado proceso de muestreo, de calibración, de instrumentos, de control en la calidad y manejo adecuado de reactivos y personal capacitado, no se podría garantizar de alguna manera el reporte de resultados veraces y su propósito principal, la producción de informes periciales de excelente calidad como respaldo para impartir justicia.

Para los laboratorios forenses, la responsabilidad en el reporte de resultados es preponderante ya que sus análisis sirven como prueba para dar certeza al juez de la comisión de un delito y por consiguiente, la imposición de la pena, por esta razón surge la idea de establecer este proyecto de tesis “VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA PARA LA DETERMINACIÓN DE *Cannabis sativa* EN MUESTRAS INCAUTADAS QUE INGRESAN AL LABORATORIO DE QUÍMICA FORENSE DEL DEPARTAMENTO DE CRIMINALÍSTICA DE CHIMBORAZO”.

La cual consiste en hacer una valoración del método tanto como de los procesos, así como la calificación de equipos y sistemas, que van a permitir al Laboratorio de Química Forense trabajar con métodos eficaces que ofrezcan alto grado de confianza y seguridad en los resultados, lo que garantizará la minimización del número de fallos y repeticiones así como también ahorro de costes en la determinación del analito correspondiente.

1.3 Justificación teórica

El propósito de la validación del método de espectroscopia infrarroja es servir de introducción, además, que el protocolo para validar métodos analíticos se lo utilice de orientación práctica a los analistas dentro del marco de sus programas internos en relación a la garantía de calidad actuales.

Así también que sirva para incitar a los laboratorios a tener en cuenta los problemas que plantea la garantía de calidad, las buenas prácticas de análisis de drogas por parte de los laboratorios.

1.4 Justificación práctica

La finalidad de la validación es asegurar que los resultados que se obtienen sean los correspondientes a los fines previstos, asimismo que sean de ayuda a los analistas como una guía práctica en cuanto a la manera de validar métodos cualitativos enfocándose en el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados que faciliten a identificar de un modo rápido y sistemático los requisitos que han de cumplirse para la validación.

1.5 Objetivos

1.5.1 *Objetivo general*

Validar el método de Espectroscopia Infrarroja para la determinación de *Cannabis sativa* en muestras incautadas que ingresan al Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de Chimborazo.

1.5.2 *Objetivos específicos*

- Establecer experimentalmente los valores de los parámetros como selectividad, límite de detección, precisión y estabilidad con el fin de establecer un nivel de concentración definido para el análisis.
- Identificar cualitativamente la presencia de grupos delta-9-tetrahydrocannabinol en las muestras incautadas mediante el método de Espectroscopia Infrarroja.
- Comparar el método de Espectroscopia Infrarroja con el método de Cromatografía en capa fina para comprobar su efectividad en la determinación.

CAPITULO II

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Marco Filosófico o epistemológico de la investigación

Willian Herschel un astrónomo ingles describió los infrarrojos en 1800. Herschel colocó un termómetro de mercurio en el espectro obtenido por un prisma de cristal con la finalidad de medir el calor que emite cada color. Descubrió que el calor era más poente al lado del rojo del espectro y observó que allí no había luz. Este es el primer experimento que muestra que el calor puede transmitirse por una forma invisible de luz. Herschel denominó a esta radiación "rayos calóricos", denominación bastante popular a lo largo del siglo XIX que, finalmente, fue dando paso al más moderno de radiación infrarroja.^(NAKAMOTO, 1997)

Los primeros instrumentos en detectar radiación infrarroja fueron los bolómetros, que captan radiación por el aumento de temperatura por parte del detector absorbente.

A principios de los años ochenta, la mayoría de los instrumentos para la región del infrarrojo medio eran de tipo dispersivo, y empleaban redes de difracción.

Sin embargo, a partir de ese momento hubo cambios en la instrumentación del infrarrojo medio, de tal manera que los instrumentos nuevos son del tipo de transformada de Fourier en su mayoría. Los fotómetros compuestos por filtros de interferencias también sirven para medir la composición tanto de gases como de contaminantes atmosféricos.

En los últimos años, de espectrómetros de transformada de Fourier relativamente baratos se produjo una ampliación tanto en el número y tipo de aplicaciones de la radiación del infrarrojo medio. Debido a que los instrumentos interferométricos logran una mejor magnitud de la relación señal-ruido y de los límites de detección en comparación con los instrumentos dispersivos.

La región del infrarrojo medio antes se usaba para el análisis orgánico cualitativo así como también para la determinación estructural con base en los espectros de absorción. Ahora con la aparición de estos instrumentos, la región espectral del infrarrojo medio se está comenzando

ampliar en el análisis cuantitativo de muestras complejas, por medio de espectrometría de absorción y emisión. Asimismo un aumento en las aplicaciones para esta región espectral en los estudios microscópicos tanto de superficies, como para análisis de sólidos mediante reflectancia total atenuada y reflectancia difusa, medidas fotoacústicas entre otras.

La utilización de la región espectral del infrarrojo lejano, aunque en potencia bastante útil, en el pasado estuvo limitada como consecuencia de dificultades experimentales. Las escasas fuentes de este tipo de radiación son muy débiles y además se atenúan por la necesidad de utilizar filtros que seleccionan órdenes espectrales para evitar que la radiación de mayor energía que emerge de la red de dispersión alcance el detector.

Los espectrómetros de transformada de Fourier, con un rendimiento muy superior, alivian en gran parte este problema y hacen a la región espectral del infrarrojo lejano mucho más accesible para los químicos. (SKOOG, 2007, págs. 430-431)

En el laboratorio forense, la espectroscopia es una de las técnicas más utilizadas en el análisis de sustancias controladas, empleado como un método de confirmación para la identificación de compuestos orgánicos, debido a la singularidad del espectro infrarrojo en moléculas orgánicas muy similares.

2.2 Antecedentes de la investigación

Desde hace 4000 años se han usado con varios propósitos los productos de *Cannabis sativa* manteniéndose en un perfil bajo, sin embargo, a partir de los años 1960 a través de varios estudios epidemiológicos se revela que el consumo de marihuana estaba muy extendido entre adolescentes y adultos jóvenes convirtiéndose en un grave problema social y de salud pública. (HALL, 2009, págs. 374:1383-1391)

En la actualidad el consumo de marihuana se ha convertido un problema global que involucra tanto a países con ingresos altos como bajos e intermedios, de igual manera, que el consumo es mayor en personas con trastornos mentales. (HALL, 2001, págs. 31:659-668)

Las Naciones Unidas a través de los datos que genera estimó que en el año 2006 más de 160 millones de personas estaba usando productos de *Cannabis sativa*, cifra que corresponde a un 3.9% de la población mundial, con edades 15 y 64 años. (UNODC, 2007)

Se menciona además que los países donde existe un consumo más alto de marihuana es en Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda seguidos por diferentes países de Europa Occidental. Diferentes estudios revelan que hasta un 15% de la población adulta del Continente Americano y de Europa Occidental había experimentado alguna vez con marihuana. Proporción que llega al 50% entre adolescentes y adultos jóvenes.

Estados Unidos es el país que tiene un mayor consumo de drogas (alcohol, tabaco, cannabis y cocaína, en ese orden); índices que son alarmantes ya que supera ampliamente a otros países.

(DEGENHARDT, 2008, págs. 5:1053–1067.)

El mismo informe indica que la “droga” ilícita que más consumen los norteamericanos es la marihuana. La investigación de NSDUH–2008 (National Survey on Drug Use and Health-2008) menciona que 15.2 millones de estadounidenses por lo menos una vez en el mes consumieron marihuana datos que fueron revelados previo a una encuesta. (NSDUH, 2008)

Datos históricos por parte de MFS (Monitoring the Future Survey), indican que el consumo de marihuana por adolescentes y adultos jóvenes, después de un ascenso significativo en el periodo 1994–1997 y de un descenso marcado en el periodo 1998–2007, ahora siguen subiendo, debido a las nuevas regulaciones sobre la marihuana. (MFS, 2008)

En 2009 otro estudio indica que el 11.8% de los alumnos del 8° grado (12–13 años) había consumido marihuana en el año previo a la encuesta y un 6.5% de estos fueron usuarios frecuentes de dicha droga. Entre alumnos del 10° grado (15–16 años), 26.7% había consumido marihuana en el año anterior y 15.9% fueron usuarios frecuentes. En los alumnos de 12° grado (17–18 años) la incidencia fue todavía mayor; el 32.8% consumió marihuana en el año previo y 20.6% fueron usuarios regulares.

Los datos generados presentan que en Estados Unidos un 20–30% de los que alguna vez fumaron marihuana se convierten en consumidores semanales y que un 10% se convierte en usuarios cotidianos. (NIH, 2014)

En el mismo país el exceso del consumo de marihuana inicia a la edad de los 12 años, alcanza su tope entre los 20 y 25 para luego decaer, cuando los jóvenes tienen empleo, se casan o tienen hijos. De las cifras antes mencionadas se deriva que algunos usuarios admiten que fuman marihuana de 20–30 veces al mes, mientras que en otros usuarios el consumo promedio es de cinco carrujos al día.

En Ecuador, el Plan Nacional de Prevención Integral y Control de Drogas 2009-2012 indica que a nivel nacional las drogas ilícitas con un mayor consumo son marihuana, cocaína y base de pasta. En cuanto a drogas sintéticas tras la realización de investigaciones tenemos al éxtasis como droga que empieza hacer consumida en el país. (COSEP, 2010)

Dentro de las principales causas para el consumo de las sustancias psicoactivas podemos indicar: aspectos culturales, migración, desintegración familiar, escasa comunicación familiar, carencia de educación integral en los niveles educativo, laboral, comunitario-familiar, deficiencia del sistema educativo, influencia de grupo e inadecuada utilización del tiempo libre.

El carácter internacional del problema de las drogas y la delincuencia exige que los análisis de los laboratorios nacionales y sus resultados sean de calidad, dadas las importantes repercusiones que tienen en el sistema de justicia, la aplicación de la ley, la prevención de la delincuencia y del tráfico de drogas y las políticas sanitarias, así como en la armonización internacional y el intercambio mundial de información y de datos.

La elaboración de métodos analíticos de detección y valoración internacionalmente aceptables contribuye enormemente al logro de esos objetivos. Además, habiéndose reconocido la importancia de la exactitud de los análisis, se recomienda cada vez más que los laboratorios apliquen procedimientos de garantía de calidad, como la participación en programas de control de competencia y acreditación de laboratorios, y adopten buenas prácticas de laboratorio o cumplan la norma ISO/IEC 17025:2005 (UNODC, 2009)

A fin de lograr este objetivo, la UNODC ha venido publicando una serie de manuales dirigidos a los laboratorios nacionales sobre los métodos de análisis de drogas en materiales incautados y especímenes biológicos, y procura constantemente prestar asistencia a los laboratorios nacionales en las cuestiones relativas a la garantía de calidad. Para ello prepara nuevos manuales que ayuden a los laboratorios a responder a las nuevas exigencias en la materia y actualiza los ya existentes.

Recientemente se publicaron dos manuales de orientación, uno sobre la implantación de un sistema de gestión de la calidad en los laboratorios de análisis de drogas y el otro sobre la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. (UNODC, 2009)

2.3 Bases Teóricas

2.3.1 Validación

Un paso elemental que asegure que los resultados por dicho método son técnicamente válidos, exactos y confiables es a lo que se lo conoce como validación. Sin embargo, parece ser escaso saber lo que se necesita realizar, de por qué debe hacerse y cuándo debe hacerse. (EURACHEM, 1998)

En la literatura científica podemos encontrar información relacionada con los métodos de validación, principalmente acerca de métodos específicos de análisis y medición, sin embargo, estas no son manejadas adecuadamente. La mayoría de analistas no desarrollan protocolos internos de validación ya que ven a este proceso como algo que solo puede hacerse de manera externa al laboratorio.

La validación del método es fundamental porque a través de este proceso podemos conocer los parámetros de desempeño del método, además nos proporciona un alto grado de confianza y seguridad de los resultados que se obtienen. (EURACHEM, 1998)

2.3.1.1 La validación como requisito de la norma COVENIN 2534:2000

En la Norma COVENIN 2534:2000 (ISO/ICE, 1999) hay exigencias técnicas para la validación de métodos, para garantizar que el laboratorio analice y tenga bajo control los factores que incide tanto en la confiabilidad y exactitud de los resultados para los fines previstos.

Los métodos que manejan en el laboratorio establece la validación de:

- Métodos no normalizados.
- Métodos diseñados o desarrollados por el laboratorio
- Métodos normalizados utilizados fuera de su alcance proyectado
- Métodos normalizados que han sido modificados o ampliados. (USP, 2002)

De manera obligatoria el requisito establece que:

- Se debe registrar por parte de los laboratorios todos los resultados que se hayan obtenido, así como el procedimiento que se realizó para la validación del método y declarar la conformidad de que el método de ensayo es el apropiado para los fines previstos.

El rango y la exactitud de los valores (parámetros de desempeño) que se logran con los métodos validados (límite de detección, selectividad, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, robustez, etc.) tal como fueron evaluados para los fines previstos deber ser acertados a las necesidades del cliente. (GELWICKS, 2003)

El requisito sugiere que:

- Tanto el método de ensayo como la validación deben ser extensivos según así se lo requiera, tomando en cuenta que debe incluir procesos acerca del muestreo, el manejo y el transporte de la muestra a analizar.
- Para establecer los parámetros de cómo se desempeña el método se debe aplicar la calibración a través de patrones de referencia o materiales de referencia, la comparación con otros métodos de análisis para ver resultados, así como la comparación interlaboratorios y la evaluación de la incertidumbre.
- La validación debe incluir la especificación de los requisitos y la comprobación de los mismos, la determinación característica del método y una declaración sobre la validez.
- Para la validación debe haber un balance entre costos riesgos y posibilidades técnicas
(THOMPSON, 1993, págs. 2123-2144)

2.3.1.2 Tipos de validación

2.3.1.2.1 Validación retrospectiva

Este tipo de validación empleado en los laboratorios se utilizan para aquellos métodos que no están normalizados, es decir, en base de datos experimentales de un sin número de recopilación de información por parte del mismo, que incluye resultados de ensayos, curvas de calibración, cartas de control, ensayos de aptitud.

Por medio de estos, se pretende establecer los parámetros para la validación, y si los resultados obtenidos son los aceptables para los fines previstos. (ISP, 2010, pág. 20)

2.3.1.2.2 Validación prospectiva

Son aquellos que se forman mediante el análisis de datos experimentales, es decir, aquellos métodos nuevos (o uno antiguo del que no se dispongan de datos suficientes).

2.3.1.3 Validación del método

Las buenas prácticas de fabricación vigentes en los Estados Unidos (Código de Reglamentos Federales, Administración de Alimentos y Drogas), la Pharmacopoeia Convention de los Estados Unidos, la Asociación de Salud Pública Americana y la Conferencia Internacional de Armonización (JENKE, 1996, pág. 719 a 736), entre otros, forman la base varios protocolos de métodos que se hallan en bibliografía especializada y puede ser muy útil.

Además, el Grupo de trabajo científico para el análisis de drogas incautadas (SWGDRUG), la ENFSI, la UIQPA y Eurachem/CITAC ha publicado series detalladas de recomendaciones. (SWGDRUG, 2008)

Para el análisis de métodos cualitativos de análisis de drogas se exigen se cumplan los siguientes parámetros necesarios para la validación:

- Especificidad/selectividad
- Límite de detección
- Precisión (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad en laboratorio)
- Estabilidad. (PRICHAR, 1996, págs. 32-39)

En caso de tratarse de métodos cualitativos en los que es necesario establecer un nivel de concentración definido, deben agregarse tres parámetros adicionales:

- Linealidad
- Exactitud (sesgo) (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad en laboratorio) en el umbral de concentración
- Precisión (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad en laboratorio) en el umbral de concentración

2.3.1.4 *Parámetros para la validación*

2.3.1.4.1 *Especificidad (selectividad)*

La especificidad está relacionada con la capacidad en que otras sustancias pueden interferir en la identificación y, si procede, en la cuantificación de los analitos que se trate. Es decir, mide la capacidad que tiene el método analítico para identificar/cuantificar los analitos aun cuando estén presentes otras sustancias ya pueden ser de tipo endógenas o exógenas en una muestra de la matriz en las condiciones exigidas por el método.

Este parámetro depende generalmente de la concentración en el que debe determinarse el margen de error de calibración en su nivel más bajo.

Es así que la validación debe garantizar un adecuado funcionamiento del método, y que éste distinga los efectos de las impurezas, las sustancias que reaccionan entre sí, etc., que podrían intervenir en la matriz.

2.3.1.4.2 *Límite de detección*

Se refiere al menor contenido mensurable de analito detectada e identificada con un determinado grado de certidumbre. También se puede decir que el límite de detección es la menor concentración que puede diferenciarse del ruido de fondo con un cierto grado de confianza. Para evaluar este parámetro se utiliza varios métodos, los cuales van a estar en dependencia del análisis de especímenes en blanco y el examen de la relación entre la señal y el ruido. Generalmente es aceptable un mínimo de relación señal/ruido de 3/1.

Este parámetro puede verse afectado por pequeñas modificaciones del sistema analítico que involucra (por ejemplo, temperatura, pureza de los reactivos, efectos de matriz, condiciones instrumentales). Es por esta razón que se debe hacer la verificación por parte de los laboratorios que hayan adoptado métodos anteriormente validados. (EURACHEM/CITAC, 2002)

2.3.1.4.3 *Precisión (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad)*

La precisión evalúa el grado de acuerdo entre los resultados independientes de ensayos obtenidos en condiciones prescritas. Es decir, que la precisión refleja los errores aleatorios que se pueden dar cuando se utiliza un método.

La precisión se puede medir en condiciones repetibles y condiciones reproducibles.
(EURACHEM/CITAC, 2002)

La repetibilidad se basa en el que el analista analiza la muestras el mismo día, con el mismo equipo, con los mismos materiales y en el mismo laboratorio. Cualquier modificación implica que las condiciones sólo serán reproducibles (por ejemplo, diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos, diferentes laboratorios).

Este parámetro puede ser medido en términos de coeficiente de variación o desviación típica relativa de los resultados analíticos que se obtienen con la ayuda de patrones de control preparado para cada una de las muestras.

La precisión normalmente se mide en términos de coeficiente de variación o desviación típica relativa de los resultados analíticos obtenidos con patrones de control preparado independiente.

La precisión va a estar en dependencia de la concentración del analito, el cual debe calcularse a concentraciones diferentes dentro de los límites permitidos, especialmente en la parte baja, media y alta de éste.

Para que una precisión este en un rango admisible debe tener una concentración del 20% en el nivel inferior. En casos de concentraciones más altas la precisión debe ser mucho mayor.

2.3.1.4.4 Estabilidad

Este parámetro debe demostrar en qué medida pueden mantenerse estables los analitos mientras se da todo el proceso de análisis que incluye su previo y posterior almacenamiento. Generalmente se hace una comparación entre patrones recién preparados de concentración conocida con patrones similares que han sido almacenados durante varios períodos de tiempo en distintas condiciones. (EURACHEM/CITAC, 2002)

2.3.2 Espectrometría Infrarroja

La espectroscopia infrarroja se fundamenta en que cuando la radiación infrarroja incide sobre una muestra, es capaz de provocar cambios en los estados vibracionales de las moléculas constituyentes de la misma. La absorción de radiación por parte de una muestra es indicativa del tipo de enlaces y grupos funcionales presentes en la misma.

La región infrarroja (IR) del espectro comprende radiación con número de onda que varía entre 12800 y 10 cm⁻¹ o longitudes de onda de 0.78 a 1000µm.

Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los instrumentos, es conveniente dividir el espectro infrarrojo en tres regiones, a saber, infrarrojo cercano, medio y lejano. (SKOOG,

2007, págs. 430-477)

Cuadro 1-2. Regiones del espectro infrarrojo

Región	Longitud de onda (λ), μm	Número de onda ($\bar{\nu}$), cm^{-1}	Frecuencias (ν), Hz
Cercana	0.78 a 2.5	12 800 a 4000	3.8×10^{14} a 1.2×10^{14}
Media	2.5 a 50	4000 a 200	1.2×10^{14} a 6.0×10^{12}
Lejana	50 a 1000	200 a 10	6.0×10^{12} a 3.0×10^{11}
La más utilizada	2.5 a 15	4000 a 670	1.2×10^{14} a 2.0×10^{13}

Fuente: ESPECTROS IR:www.cosaslibres.com/.../principios-de-analisis-instrumental_19619.htm

2.3.2.1 Aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo

La espectrometría en el infrarrojo en la actualidad es una herramienta multifacética que se aplica a la determinación cualitativa y cuantitativa de especies moleculares de todo tipo.

Las aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo se dividen en tres grandes categorías relacionadas con tres regiones espectrales.

Cuadro 2-2. Principales aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo

Regiones espectrales	Tipo de medición	Tipo de análisis	Tipo de muestras
Infrarrojo cercano	Reflectancia difusa	Cuantitativo	Materiales comerciales sólidos o líquidos
	Absorción	Cuantitativo	Mezclas gaseosas
Infrarrojo medio	Absorción	Cualitativo	Sólidos, líquidos o gaseosos puros
		Cuantitativo	Mezclas complejas de gases, líquidos o sólidos
	Reflectancia	Cromatográfico	Mezclas complejas de gases, líquidos o sólidos
		Cualitativo	Sólidos o líquidos puros
Infrarrojo lejano	Emisión	Cuantitativo	Muestras atmosféricas
	Absorción	Cualitativo	Especies inorgánicas puras u organometálicas

Fuente: APLICACIONES IR:www.cosaslibres.com/.../principios-de-analisis-instrumental_19619.htm

La región que mayormente es utilizada es la del infrarrojo medio, que se extiende desde casi 670 hasta 4000cm⁻¹(2.5 y 14.9µm). Son utilizados los espectros de absorción, reflexión y emisión tanto para análisis cualitativos y cuantitativos.

La región del infrarrojo cercano comprendida entre 4000 y 14000cm^{-1} (0.75 y $2.5\mu\text{m}$), del mismo modo es muy utilizado en la determinación cuantitativa rutinaria de ciertas especies, como agua, dióxido de carbono, azufre, hidrocarburos de bajo peso molecular, nitrógeno de las aminas y muchos otros compuestos sencillos de interés tanto en la agricultura y a la industria.

A menudo, estas determinaciones se basan en medidas de la reflectancia difusa de muestras sólidas o líquidas sin tener un tratamiento previo o en estudios de absorción de gases. El principal uso de la región infrarroja lejana (15 a $1000\mu\text{m}$) es en la determinación de estructuras de especies inorgánicas y órgano metálicas con base en mediciones de absorción. (SKOOG, 2007)

2.3.2.2 *Espectrometría de absorción en el infrarrojo medio*

La espectrometría de absorción y reflexión en la región del infrarrojo medio es el principal instrumento para determinar la estructura de tanto de especies orgánicas como bioquímicas.

2.3.2.2.1 *Manipulación de la muestra*

Líquidos: La cantidad de muestra líquida puede ser no representativa para el análisis requerido, así como también de no disponer del solvente adecuado, para esto es usual obtener los espectros del líquido puro. Es así que tan solo una muy delgada película tiene una longitud de trayectoria lo suficientemente corta para provocar espectros satisfactorios.

Generalmente, una gota del líquido puro se presiona entre dos placas de sal gema (NaCl 97%, pureza) para obtener una lámina de aproximadamente 0.015 mm o menos de espesor. Las placas que se encuentran unidas por capilaridad, deben ser colocadas en la trayectoria del haz. Esta técnica no nos asegura datos de transmitancia particularmente reproducibles, pero en este caso, los espectros obtenidos son satisfactorios para las investigaciones cualitativas.

Sólidos: Por lo general los compuestos orgánicos presentan un sin número de bandas de absorción en el infrarrojo medio y a menudo es imposible hallar un solvente que no dé lugar al traslape de picos. Es por esto que generalmente los espectros se obtienen en dispersiones del sólido en una matriz líquida o sólida.

En estos casos, se procede a pulverizar la muestra sólida hasta que el tamaño de sus partículas sea menor que la longitud de onda de la radiación para de esta manera impedir que se den los efectos de dispersión de la radiación.

2.3.2.3 Análisis cualitativo

2.3.2.3.1 Frecuencias de grupo

Las frecuencias de grupo son de gran importancia ya que pueden ayudarnos en conjeturas inteligentes acerca de cuáles son los grupos funcionales con mayor probabilidad de presentarse o no en una molécula.

Generalmente, es muy difícil saber el origen de todas las bandas presentes en un determinado espectro sin saber su ambigüedad, así como el poder establecer la identidad exacta de una molécula. Estas frecuencias de grupo nos sirven como punto de partida para el proceso de identificación. (SKOOG, 2007)

Cuadro 3-2. Frecuencias de grupo para grupos orgánicos funcionales

Enlace	Tipo de compuesto	Frecuencias, cm^{-1}	Intensidad
C—H	Alcanos	2850–2970	Fuerte
		1340–1470	Fuerte
C—H	Alquenos (>C=C<H)	3010–3095	Media
		675–995	Fuerte
C—H	Alquinos ($\text{—C}\equiv\text{C—H}$)	3300	Fuerte
C—H	Anillos aromáticos	3010–3100	Media
		690–900	Fuerte
O—H	Alcoholes monoméricos, fenoles	3590–3650	Variable
	Alcoholes con puentes de hidrógeno, fenoles	3200–3600	Variable, a veces amplia
	Ácidos carboxílicos monoméricos	3500–3650	Media
	Ácidos carboxílicos con puentes de hidrógeno	2500–2700	Amplia
N—H	Aminas, amidas	3300–3500	Media
C=C	Alquenos	1610–1680	Variable
		1500–1600	Variable
C=C	Anillos aromáticos	1500–1600	Variable
		2100–2260	Variable
C=N	Aminas, amidas	1180–1360	Fuerte
C=N	Nitrilos	2210–2280	Fuerte
C—O	Alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ésteres	1050–1300	Fuerte
C=O	Aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres	1690–1760	Fuerte
NO ₂	Compuestos nitro	1500–1570	Fuerte
		1300–1370	Fuerte

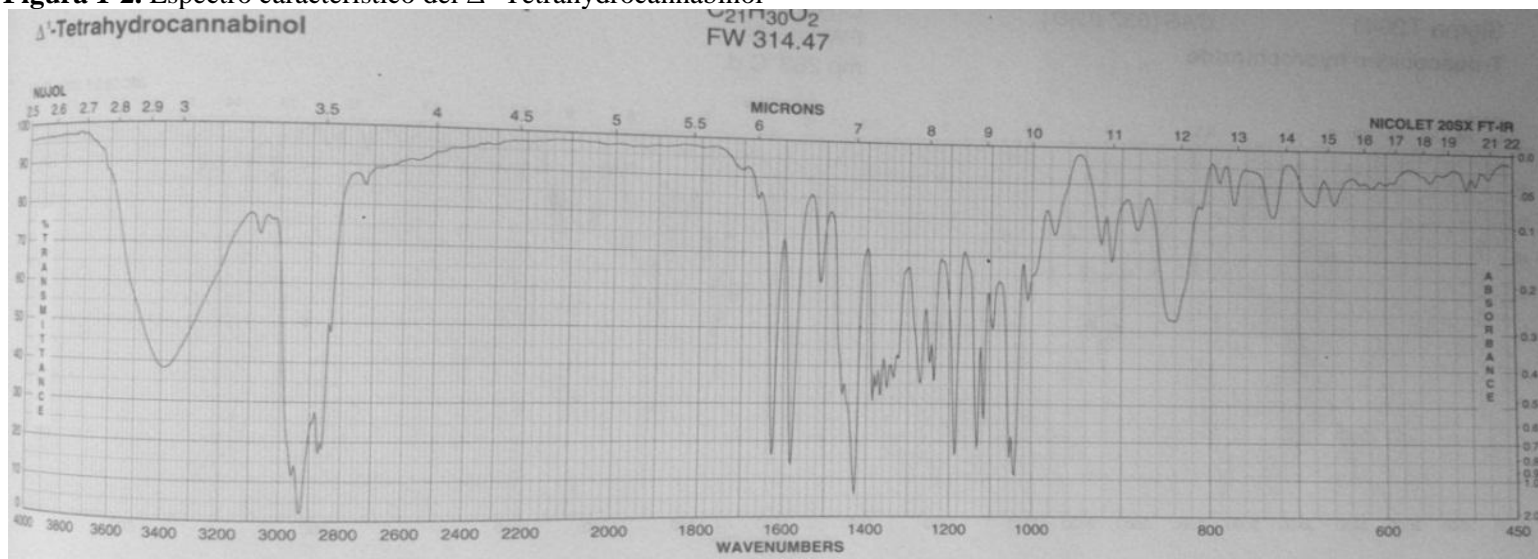
Fuente: APLICACIONES IR: www.cosaslibres.com/.../principios-de-analisis-instrumental_19619.htm

2.3.2.3.2 Región de la huella dactilar

Pequeñas modificaciones tanto en la estructura como en la constitución de las moléculas pueden dar lugar a cambios significativos, en la manera de cómo se da la distribución de los máximos de absorción en la región del espectro que se extiende desde alrededor de 1200 hasta 600 cm^{-1} (8 a 14 μm). Es decir, que la región de la huella dactilar sirve para la identificación de compuestos al hacer una comparación de los espectros.

2.3.2.3.3 Espectros de componentes forenses importantes

Figura 1-2. Espectro característico del Δ^9 -Tetrahydrocannabinol



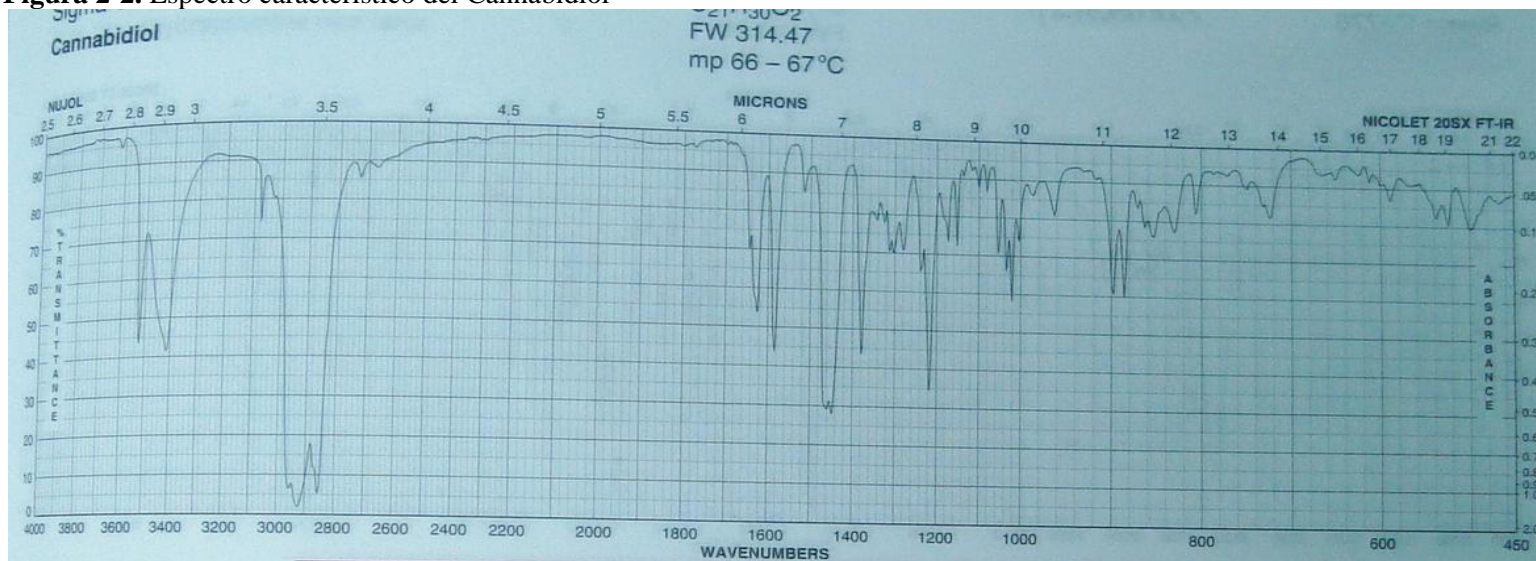
Fuente: EQUIPO INFRARROJO: Manual Nicolet 20SX FT-IR

Tabla 1-2. Frecuencias de grupo para Δ^9 -Tetrahydrocannabinol

Enlace	Tipo de compuesto	Frecuencias, cm^{-1}	Intensidad
C - H	Alcanos	2850-2970	Fuerte
		1340-1470	Fuerte
C = C	Alquenos	1610-1680	Variable
C = C	Anillo aromático	1500-1600	Variable
O - H	Alcoholes monoméricos, fenoles	3590-3650	Variable
	Alcoholes con puentes de hidrógeno, fenoles	3200-3600	Variable, a veces amplia
C - O	Éter	1050-1300	Fuerte

Fuente: ROYSTON, Roberts., et al. Modern experimental organic chemistry

Figura 2-2. Espectro característico del Cannabidiol



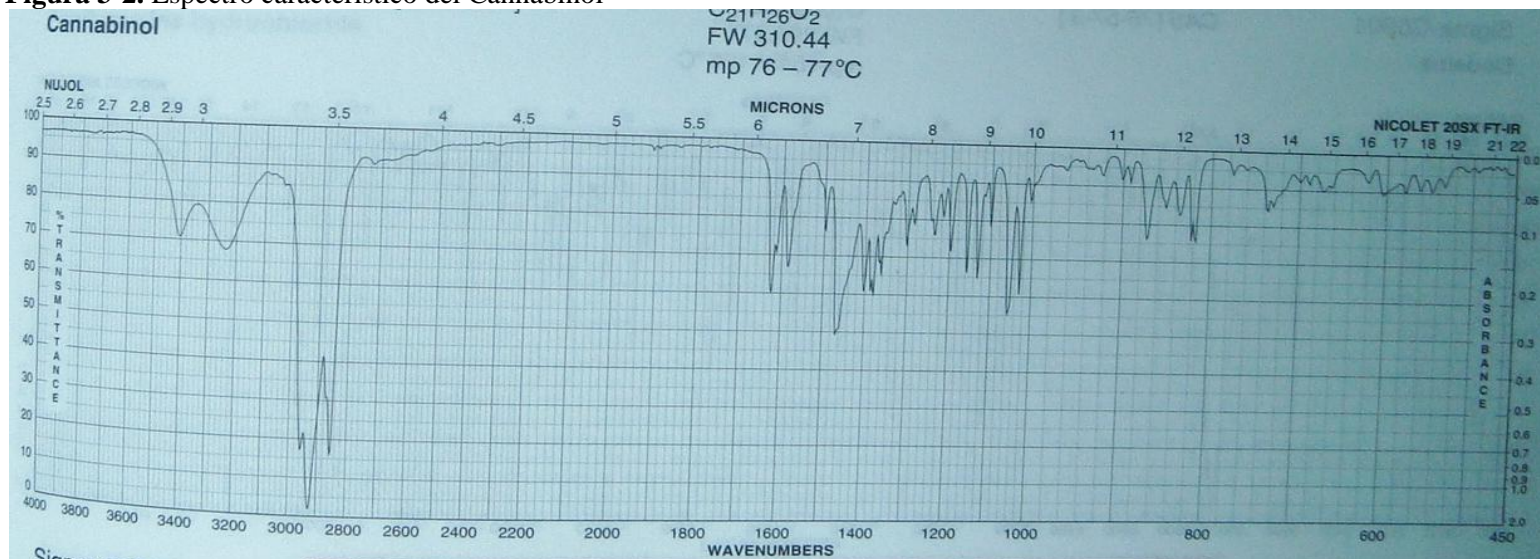
Fuente: EQUIPO INFRARROJO: Manual Nicolet 20SX FT-IR

Tabla 2-2. Frecuencias de grupo para Cannabidiol

Enlace	Tipo de compuesto	Frecuencias, cm ⁻¹	Intensidad
C - H	Alcanos	2850-2970	Fuerte
		1340-1470	Fuerte
C = C	Alquenos	1610-1680	Variable
C = C	Anillo aromático	1500-1600	Variable
O - H	Alcoholes monoméricos, fenoles	3590-3650	Variable
	Alcoholes con puentes de hidrógeno, fenoles	3200-3600	Variable, a veces amplia

Fuente: ROYSTON, Roberts., et al. Modern experimental organic chemistry

Figura 3-2. Espectro característico del Cannabinol



Fuente: EQUIPO INFRARROJO: Manual Nicolet 20SX FT-IR

Tabla 3-2. Frecuencias de grupo para Cannabinol

Enlace	Tipo de compuesto	Frecuencias, cm^{-1}	Intensidad
C - H	Alcanos	2850-2970	Fuerte
		1340-1470	Fuerte
C = C	Anillo aromático	1500-1600	Variable
O - H	Alcoholes monoméricos, fenoles	3590-3650	Variable
	Alcoholes con puentes de hidrógeno, fenoles	3200-3600	Variable, a veces amplia
C - O	Éter	1050-1300	Fuerte

Fuente: ROYSTON, Roberts., et al. Modern experimental organic chemistry

2.3.2.4 Instrumentos para el infrarrojo

Para hacer la medición de la absorción en el infrarrojo existen tres tipos de instrumentos:

- Espectrofotómetros dispersivos con monocromador de red
- Espectrómetros de transformada de Fourier con interferómetro y
- Fotómetros no dispersivos equipados con un filtro o un gas absorbente que es de gran ayuda en el análisis de gases atmosféricos a longitudes de onda determinadas.

Por los años ochenta los espectrofotómetros dispersivos fueron los instrumentos más utilizados para mediciones en el infrarrojo. Hoy en día, estos instrumentos fueron desplazados por equipos modernos como espectrómetros de transformada de Fourier para efectuar mediciones en el infrarrojo mediano y lejano, debido a su velocidad, confiabilidad, ventaja en la relación señal-ruido y comodidad. Los espectrómetros dispersivos se siguen utilizando debido a su aplicabilidad en el infrarrojo cercano, y se dice que son extensiones de los instrumentos UV-visible, pero la mayoría de los instrumentos específicos para el infrarrojo cercano son del tipo de transformada de Fourier.

2.3.2.4.1 Espectrómetros de transformada de Fourier

Se describen dos tipos de instrumentos multiplex para la región del infrarrojo. El primero es el espectrómetro de transformada de Fourier cuya codificación se la consigue al dividir la fuente en dos haces donde la longitud de trayectoria puede variar en forma periódica para dar patrones de interferencia. Es decir, se utiliza para trabajar con los datos. El segundo tipo es un espectrómetro de transformada de Hadamard, que es un instrumento de tipo dispersivo que utiliza una plantilla móvil en el plano focal del monocromador para codificar los datos espectrales.

Figura 4-2. Espectrómetro sencillo IR de transformada de Fourier



FUENTE: Thermo Electron Corp., Madison, WI.

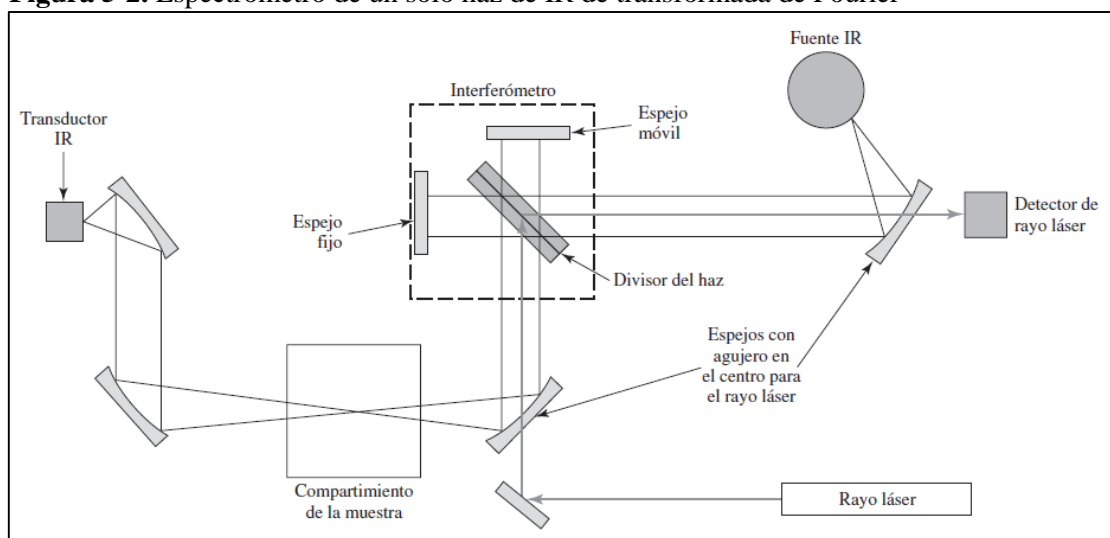
Ventajas de la espectrometría de transformada de Fourier: El uso de los instrumentos de transformada de Fourier tiene grandes ventajas:

- La primera es el rendimiento o también conocido como ventaja Jaquinot, que se consigue debido a que los instrumentos de transformada de Fourier poseen pocos elementos ópticos y no presentan rendijas que atenuen la radiación. Como consecuencia, la potencia radiante que llega al detector es bastante mayor que en un instrumento dispersor, y pueden observarse de mejor manera las relaciones señal-ruido.
- La segunda ventaja tiene que ver con su enorme potencia de resolución y la capacidad de reproducción de la longitud de onda, lo cual permite que se facilite principalmente el análisis de espectros complejos en los que el número absoluto de líneas y espectros imbricados dificultan la determinación de las características espectrales de manera individual.
- Una tercera ventaja es que todos los elementos que componen la fuente llegan al detector de manera simultánea. Como resultado dicha característica ayuda a la obtención de datos de un espectro completo en un segundo o menos.

2.3.2.4.2 Diseños de instrumentos

Los espectrómetros de infrarrojo de transformada de Fourier son instrumentos de un solo haz o de doble haz.

Figura 5-2. Espectrómetro de un solo haz de IR de transformada de Fourier



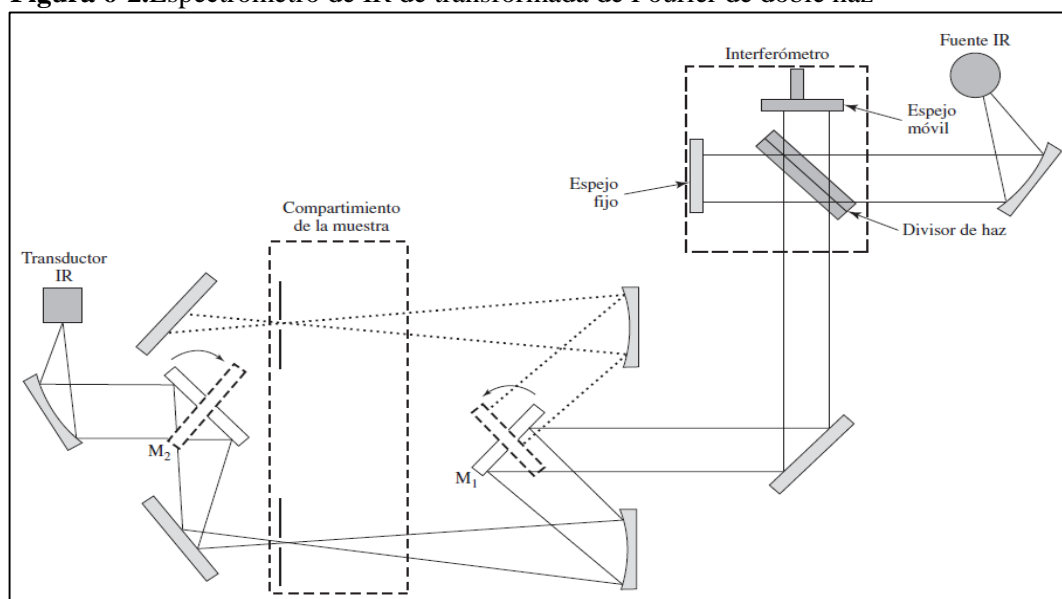
FUENTE. Thermo Electron Corp., Franklin, MA.

En una rama del interferómetro, la radiación de la fuente IR pasa por el divisor de haz y llega hasta el espejo fijo, regresa al divisor de haz y atraviesa la muestra para llegar al transductor de IR. En la otra rama, la radiación de la fuente IR viaja al divisor del haz, se refleja en el espejo móvil y regresa por el divisor de haces hasta la muestra y llega al transductor. Cuando los dos rayos se encuentran de nuevo en el divisor de haces, tienen la aptitud de interferir uno con el otro si la diferencia de fase es apropiada (diferencia de la trayectoria).

El interferograma es una gráfica de la señal contra el desplazamiento del espejo que contiene información respecto a todas las frecuencias presentes. El espectro, intensidad contra número de onda, es la transformada de Fourier del interferograma. Se puede calcular mediante una computadora a partir de la señal contra el desplazamiento del espejo.

Un compartimiento para la muestra vacío permite calcular el espectro de referencia. Luego se coloca la muestra en el compartimiento y se obtiene su espectro. Luego se determina la absorbancia a cada número de onda a partir de la relación entre la intensidad de la muestra y la intensidad de referencia. (SKOOG, 2007).

Figura 6-2. Espectrómetro de IR de transformada de Fourier de doble haz



FUENTE. Thermo Electron Corp., Franklin, MA.

El rayo que sale del interferómetro choca contra el espejo M1, el cual en una posición dirige el haz a través de la celda de referencia, y en la otra posición lo dirige a través de la celda de la muestra. El espejo M2, que está sincronizado con M1, dirige de manera alternada el haz de referencia y el haz de la muestra hacia el transductor. (SKOOG, 2007)

2.3.2.4.3 Instrumentos dispersivos

Este tipo de espectrofotómetros de infrarrojo dispersivos presentan generalmente un doble haz, que poseen registradores, que incluyen redes de reflexión para dispersar la radiación, este diseño de doble haz es menos riguroso con respecto al funcionamiento de las fuentes y detectores, lo que hace que sea una característica esencial debido a la intensidad relativamente baja de las fuentes de infrarrojo, la baja sensibilidad de los transductores de infrarrojo y la constante necesidad de ampliar mucho la señal.

Se encuentran equipados los equipos espectrofotómetros de infrarrojo dispersivos con un troceador de baja frecuencia (de 5 a 30 ciclos por segundo), el cual cumple con un papel importante al momento de discriminar entre la señal de la fuente y las señales de radiación extrañas al detector. Debido a que los tiempos de respuesta son lentos por parte de los transductores de infrarrojo que se ocupan en la mayor parte de los instrumentos dispersivos, se requieren velocidades bajas del troceador.

2.3.2.4.4 Instrumentos no dispersivos

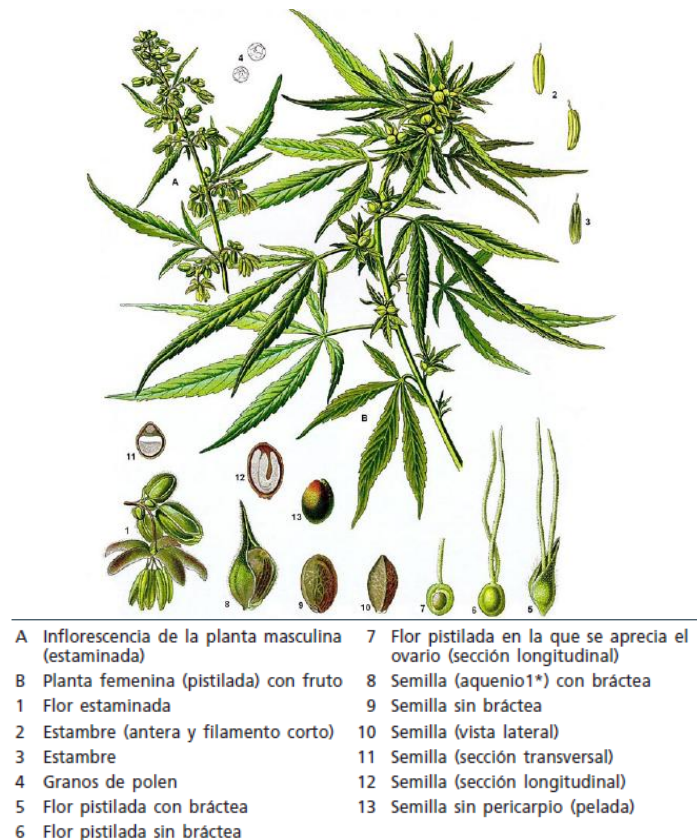
Especialmente se han elaborado instrumentos sencillos y fuertes para análisis de tipo cuantitativo en el infrarrojo. Unos son fotómetros de filtro básico, y otros utilizan filtros de cuna en remplazo de un elemento dispersante para espectros completos. Finalmente ciertos analizadores de gas no están provistos con ningún dispositivo para seleccionar longitud de onda. Generalmente no son complicados, son más resistentes, más fáciles de mantener y mucho más baratos.

2.3.3 *Cannabis sativa*

Planta herbácea de la familia *Cannabaceae*, principalmente dioica, las regiones más aptas para su cultivo son las tropicales y subtropicales. El tallo de esta planta es usado para la fabricación de fibras textiles, sus semillas de tipo oleaginoso producen un aceite, mientras que sus glándulas de las inflorescencias (cogollos) producen una resina. En muchos países el cultivo de ésta planta está prohibido o restringido por la ley debido sus propiedades psicoactivas. El término es usado para el producto elaborado a partir de las hojas, flores y tallos pequeños del *Cannabis*. Mientras que el término *hachís* está dado a la pasta fabricada con la resina prensada.

Hace pocos años el término cannabinoides era apto para productos con estructura química de Carbono y metabolitos propios del *Cannabis*, hoy en día el término *Cannabis* es otorgado al conjunto de moléculas unidas a receptores cannabinoides, entre los cuales se incluyen los ligandos endógenos (endocannabinoides) y los análogos sintéticos (exocannabinoides). (Grotenhermen, 2003, págs. 42:327–360)

Figura 7-2. Aspectos morfológicos de la marihuana



Fuente: Manual para uso de los laboratorios nacionales de estupefacientes

2.3.3.1 Química

El *Cannabis sativa* está compuesto por más de 400 productos de tipo químico como azúcares, flavonoides, compuestos nitrogenados, aminoácidos, mono y sesquiterpenos e hidrocarburos, además de 66 cannabinoides, siendo su principal psicoestimulante el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC). El porcentaje de Δ^9 -THC varía ampliamente entre plantas de distinto origen. Por ejemplo en la *Cannabis silvestre* contiene Δ^9 -THC está presente entre 0.5% al 5%; y en el hachís del 2–20%. (Hall W, 2009, págs. 374:1383–1391)

Las distintas concentraciones dependen si el tipo de cultivo es natural o a condiciones controladas pasando por el cultivo con luz natural o artificial, hasta el cultivo hidropónico. En

las últimas tres décadas los avances en el desarrollo de nuevas técnicas han arrojado como resultado un incremento drástico la concentración de Δ^9 -THC. Desde 1960 a 1970 el contenido de Δ^9 -THC de un cigarrillo de marihuana era de 10 mg. En la actualidad se puede obtener una concentración de 150 a 300 mg de Δ^9 -THC por técnicas especiales. (ASHTON, 2001, págs. 178:101-106)

2.3.3.2 Farmacocinética

La marihuana puede ser consumida por diferentes vías, la más común es la inhalación, ésta administración es absorbida de manera rápida y la cantidad inhalada corresponde a la cantidad absorbida, el humo de la marihuana en los pulmones se absorbe por la alta solubilidad de sus componentes principalmente el Δ^9 -THC, él mismo que ayuda a penetrar a través de la membrana de los capilares alveolares y lograr alcanzar la circulación pulmonar, posteriormente la circulación sistémica y por último el Sistema Nervioso Central, en el cual pone de manifiesto sus principales efectos.

Terapéuticamente se han realizado estudios administrando marihuana por diferentes vías como: oral, rectal, dérmica, oral, sublingual entre otras, logrando como resultados más alentadores las vías oral y rectal, por ejemplo con la administración por vía oral las concentraciones plasmáticas de Δ^9 -THC tienden a la alza en un tiempo de 1 a 3 horas, alcanzando a los 120-180 minutos su mayor concentración y sus efectos son percibidos entre 5-12 horas sin un pico de efecto definido. (Grotenhermen, 2003, págs. 42:361-365)

Por la vía oral no hay pérdida total de la actividad, la cantidad de Δ^9 -THC absorbida corresponde a un 25-30% de la que se absorbería fumando la misma proporción. Hay que resaltar que la administración por vía rectal tiene una mayor biodisponibilidad que la correspondiente a la vía oral.

El componente principal (Δ^9 -THC) es poco afín a las proteínas plasmáticas, por lo mismo su distribución en el cuerpo humano es amplia y sólo del 5 al 24% alcanza el sistema nervioso central. Éste componente es acumulado principalmente en el bazo y en el tejido adiposo, de los cuales se desprende lentamente. Gracias a su elevada liposolubilidad atraviesa las barreras placentaria y hematoencefálica, además de llegar a la leche materna.

El hígado es el principal órgano que metaboliza los componentes pertenecientes a la marihuana. Estudios muestran que existen más de 100 metabolitos del Δ^9 -THC, algunos de los mismos son activos, otorgándoles una vida media muy variable con una tendencia general de 24 a 72

horas, el principal metabolito es el 11-OH- Δ^9 -THC, con una vida media plasmática de 15 a 18 horas.

El Δ^9 -THC puede estar en el cuerpo hasta por 45 días posteriores a su administración, y que una sola dosis de Δ^9 -THC puede ser detectado hasta por más de 4 días en la orina. (RICHARD, 1985, págs. 1093-1096)

2.3.3.3 Distribución de Δ^9 -THC en las plantas y los productos del Cannabis

La distribución de THC va a depender del lugar de la planta de que se trate:

Cuadro 4-2. Distribución de THC

10 a 12%	En las flores pistiladas
1 a 2%	En las hojas
0,1 a 0,3%	En los tallos
< 0,03%	En las raíces

Fuente: UNODC: Manual para uso de los laboratorios nacionales de estupefacientes

La proporción de las diferentes partes de la planta nos permiten calcular el contenido de THC, así mismo también éste contenido dependerá de la procedencia del Cannabis (aceite, resina, Hierba), conociendo que presentará mayor contenido en aceite.

2.3.3.4 Biosíntesis

Los ácidos THC, CBD y cannabicromero (CBD) son el fruto de una descarboxilación.

Mientras que el THCA, precursor del THC es obtenido partiendo del ácido cannabirólico (CBGA) gracias a una oxidación enzimática del THCA THCA-synthase, el mismo que es precursor del ácido cannabidiólico (CBDA) y el ácido cannabicroménico (CBCA).

El cannabinol (CBN) no es obtenido de manera natural, sino por degradación del THC.

2.3.3.5 *Productos del cannabis*

2.3.3.5.1 *Hierba de cannabis*

Las sumidades floridas y con fruto y las hojas situadas cerca de las sumidades floridas son las partes que contienen mayor cantidad de THC. Cabe recalcar que son solo estas partes las que más se comercializan en el mercado ilícito.

Cerca de las sumidas floridas masculinas existe THC pero en bajas concentraciones y por lo mismo no son hojas de mayor demanda. También podemos citar la misma analogía para la producción del aceite extraído de los tallos secundarios y del tallo principal del cannabis que contienen poco THC.

Lo que llamamos “marihuana” en esencia son las flores y hojas secas del cannabis, la cual no sufre mayores alteraciones al ser distribuida, pero sí puede ser vendida en diferentes presentaciones dependiendo del lugar en la que se la trafique.

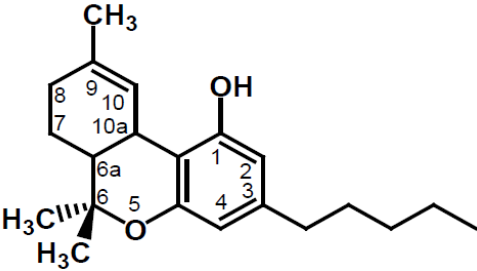
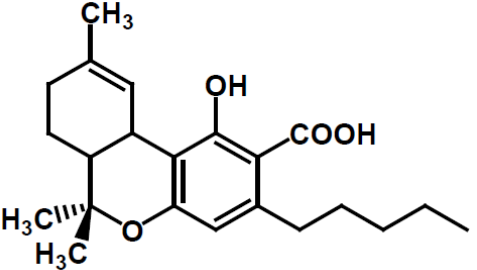
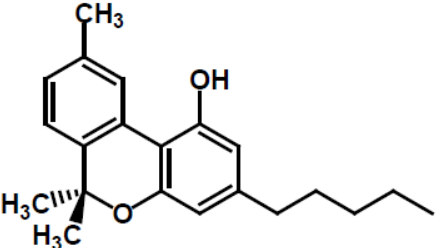
Por medio de un cedazo podemos separar las partes con menor contenido de THC como semillas y tallo, obteniendo así un producto de mayor calidad en el cual estarán presentes las sumidades, floridas o con fruto, arrojando un alto contenido de THC. Éste producto es conocido como “Kif” y es propio de los países del norte, obteniéndose en el mercado principalmente en presentación de tabletas.

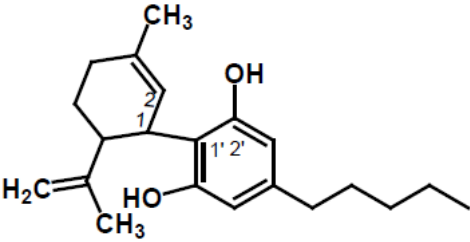
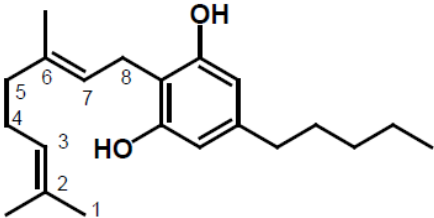
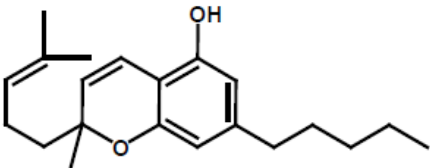
Los híbridos producidos en el interior como el “skunk” y la “viuda blanca” son propios de países europeos, ésta forma de producir cannabis da como resultado una alta calidad y alta potencia ya que se mantienen las condiciones óptimas del cultivo. En la actualidad no es de asombrarse que el contenido de THC supere el 10%, su resina el 25% y el aceite el 60%.

El secado es muy sencillo de ejecutarlo, solamente se retiran las partes del cannabis que contienen la droga para ponerlas a secar, este proceso termina cuando las hojas se sitúen cerca de las sumidades floridas, el tiempo necesario depende de las condiciones climáticas (humedad, temperatura), el producto es almacenado aunque el TDC es degradado con el pasar del tiempo y la exposición a la luz, aire o humedad.

2.3.3.6 Componentes químicos de importancia forense

Cuadro 5-2. Componentes químicos de la marihuana

<p style="text-align: center;">(-)-Δ^9-trans-tetrahydrocannabinol Tetrahydrocannabinol, THC</p>  <p>Principales características farmacológicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Euforizante - Anti-inflamatorio - Analgésico - Antiemético 	<p>CAS: 1972-08-3 Fórmula empírica: C₂₁H₃₀O₂ Peso molecular: 314,46 g/mol Punto de fusión: aceite viscoso pKa: 10,6 log P: 6,99 (octanol/agua)</p> <p>Solubilidad:</p> <p>Agua: insoluble (2,8 mg/L 23°C)</p> <p>Etanol: soluble Cloroformo: soluble Hexano: soluble</p>
<p style="text-align: center;">(-)-Δ^9-trans-ácido tetrahydrocannabinólico, THCA</p>  <p>Principales características farmacológicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Antibacterial - Antibiótico 	<p>CAS: 23978-85-0 Fórmula empírica: C₂₂H₃₀O₄ Peso molecular: 358 g/mol Punto de fusión: n/a (descomposición/ descarboxilación de TCHA a THC a aprox. 125-150°C)</p> <p>Solubilidad:</p> <p>Agua: insoluble Etanol: soluble Cloroformo: soluble Hexano: soluble</p>
<p style="text-align: center;">Cannabinol CBN</p>  <p>Principales características farmacológicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sedante - Anticonvulsivo - Antibiótico - Anti-inflamatorio 	<p>CAS: 521-35-7 Fórmula empírica: C₂₁H₂₆O₂ Peso molecular: 310,43 g/mol Punto de fusión: 76-77 °C log P: 6,23 (octanol/agua)</p> <p>Solubilidad:</p> <p>Agua: insoluble Etanol: soluble Cloroformo: soluble Hexano: soluble</p>

<p style="text-align: center;">Cannabidiol CBD</p>  <p>Principales características farmacológicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ansiolítico - Antipsicótico - Analgésico - Anti-inflamatorio - Antiespasmódico 	<p>CAS: 13956-29-1</p> <p>Fórmula empírica: $C_{21}H_{30}O_2$</p> <p>Peso molecular: 314,46 g/mol</p> <p>Punto de fusión: 66–67 °C</p> <p>log P: 5,79 (octanol/agua)</p> <p>Solubilidad:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 70%;">Agua</td> <td style="text-align: right;">insoluble</td> </tr> <tr> <td>Etanol</td> <td style="text-align: right;">soluble</td> </tr> <tr> <td>Cloroformo</td> <td style="text-align: right;">soluble</td> </tr> <tr> <td>Hexano</td> <td style="text-align: right;">soluble</td> </tr> </table>	Agua	insoluble	Etanol	soluble	Cloroformo	soluble	Hexano	soluble
Agua	insoluble								
Etanol	soluble								
Cloroformo	soluble								
Hexano	soluble								
<p style="text-align: center;">Cannabigerol CBG</p>  <p>Principales características farmacológicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Antibiótico - Antimicótico - Anti-inflamatorio - Analgésico 	<p>CAS: [25654-31-3] (E); [95001-70-0] (E/Z)</p> <p>Fórmula empírica: $C_{21}H_{32}O_2$</p> <p>Peso molecular: 316,48 g/mol</p>								
<p style="text-align: center;">Cannabicromeno CBC</p>  <p>Principales características farmacológicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anti-inflamatorio - Antibiótico - Antimicótico - Analgésico 	<p>CAS: 20675-51-8</p> <p>Fórmula empírica: $C_{21}H_{30}O_2$</p> <p>Peso molecular: 314,46 g/mol</p>								

Fuente: UNODC: Manual para uso de los laboratorios nacionales de estupefacientes

CAPITULO III

3 METODOLOGÍA

- Diseño experimental
- Protocolo
- Técnica para la validación del método de análisis

3.1 Diseño experimental

3.1.1 *Características del diseño experimental*

- **LUGAR:** Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de Chimborazo
- **CANTÓN:** Riobamba
- **PROVINCIA:** Chimborazo

3.1.2 *Factores de estudio*

Población

Esta determinado para el análisis de una población de acuerdo a las muestras ingresadas al Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de Chimborazo en el período Septiembre 2014 – Enero 2015.

Muestra

Se trabajará con un número de 50 muestras las cuales provienen de las diferentes provincias pertenecientes a la Zona 3 que incluye Cotopaxi, Chimborazo, Pastaza y Tungurahua que ingresan al Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de Chimborazo.

3.1.3 Manejo específico del experimento

3.1.3.1 Lugar y Pruebas de ensayo

- Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de Chimborazo

Las pruebas a realizarse según la UNODC, 2010.

- Especificidad (selectividad)
- Límite de detección
- Precisión
- Estabilidad

3.2 Protocolo

3.2.1 Cadena de custodia

Es una normativa jurídica que implica procedimientos técnicos científicos para garantizar la integridad, conservación y traslado de las evidencias orgánicas e inorgánicas.

Procedimiento:

- A)** Toma de muestras incautadas por parte de los peritos del Departamento de Antinarcóticos, y recolección de indicios o cualquier otra evidencia existente en el lugar de los hechos.
- B)** Traslado de la evidencia al laboratorio de análisis, por un agente, policía o analista.
- C)** Entrega de los resultados o informes por parte del analista acreditado por el consejo de la judicatura al señor Agente Fiscal de turno, el cual solicita mediante un oficio de la manera más rápida, concisa y exacta el análisis con fines investigativos.

Característica de la hoja de custodia: La hoja de custodia consta de lo siguiente:

- Características de la evidencia que se entrega, peso, volumen, embalaje, material, etc.
- Nombre, firma y cédula de identidad de la persona que entrega las muestras.
- Nombre, firma y cédula de identidad de la persona que recibe las muestras.

- Fecha y hora de entrega.
- Empresa que realiza el transporte si se daría el caso.


Chequear el número de referencia de cada muestra y constatar con el formulario enviado y comprobar la integridad de los precintos.


Al abrir las fundas comprobar que las muestras y descripción de las mismas son correctas.


Fotografiar lo indicado y guardar las muestras para su posterior análisis.

3.2.2 Técnicas para el análisis de *Cannabis sativa*

Tabla 1-3. Ensayos presuntivos para *Cannabis sativa*

ENSAYOS	FUNDAMENTO	MATERIALES	TÉCNICA	VISUALIZACIÓN
<p>ENSAYOS PRESUNTIVOS</p>	<p>Formación de Color:</p> <p>Las reacciones del color se deben a compuestos que tienen una estructura química concreta. El color obtenido en un determinado ensayo puede variar en función de las condiciones en que se realiza, la cantidad de sustancia empleada y la presencia de material extraño en la muestra.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Guantes - Balanza analítica - Tubo de ensayo - Mortero - Pistilo - Pipetas - Pera - Espátula 	<p>DUQUENOIS – LEVINE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pesar 0,4 gramos de Vainillina - Añadir 20mL de Etanol al 95% - Colocar 0,5mL de acetaldehído <p>Colocar una pequeña cantidad de muestra triturada sospechosa en un tubo de ensayo. Añadir 2mL del reactivo de Duquenois-Levine y agitar el tubo de ensayo. Añadir 2mL de ácido clorhídrico concentrado, agitar y dejar en reposo durante 10 minutos, si aparece color azul añadir 2mL de cloroformo.</p> <p>Resultados: Si la capa inferior (cloroformo) se vuelve color violeta es positivo para <i>Cannabis sativa</i>.</p>	


		<ul style="list-style-type: none"> - Guantes - Balanza analítica - Papel filtro - Mortero - Pistilo - Pipetas - Espátula - Vaso de precipitación - Gotero 	<p style="text-align: center;">SAL DE AZUL SÓLIDO B</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pesar 0,2 gramos de sal de azul sólido B - Añadir 50mL de NaOH 0,1N <p>Colocar una pequeña cantidad de muestra triturada sospechosa en un tubo de ensayo.</p> <p>Añadir 1mL del reactivo de Sal de azul sólido B y agitar el tubo de ensayo.</p> <p>Resultados: Color de marrón a violeta, positivo para la presencia de <i>Cannabis sativa</i>.</p>	
--	--	--	---	--

	<p>Observación microscópica:</p> <p>Identificación de <i>Cannabis sativa</i> por las estructuras microscópicas que presenta la superficie de la planta, es decir, por los tricomas (formaciones semejantes a un cabello proyectadas desde una célula epidérmica de la planta).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopio - Placa portaobjeto - Placa cubreobjeto 	<p>Triturar una pequeña cantidad de muestra sospechosa hasta que quede muy fino.</p> <p>Colocamos en una placa portaobjeto una gota de suero fisiológico; colocar una pequeña fracción de la muestra sospechosa, cubrir con una laminilla; observar al microscopio con lente 40x.</p> <p>Resultados: Presencia de tricomas cistolíticos.</p>	
--	---	---	---	---

Fuente: Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de Chimborazo

Tabla 2-3. Ensayos confirmatorios para *Cannabis sativa*

ENSAYOS	FUNDAMENTO	MATERIALES	TÉCNICA	CÁLCULO
<p align="center">ENSAYOS CONFIRMATORIOS</p>	<p align="center">Cromatografía de Capa Fina:</p> <p>Se basa en el principio del reparto entre dos fases. En general, una cromatografía se realiza permitiendo que la mezcla de moléculas que se desea separar (muestra) interaccione con un medio o matriz de soporte que se denomina fase estacionaria. Un segundo medio (la fase móvil) que es inmisible con la fase estacionaria se hace fluir a través de ésta para "lavar" (eluir) a las moléculas en la muestra. Debido a que las distintas moléculas en la muestra presentan diferente coeficiente</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mortero - Pistilo - Tubo de ensayo - Pipetas - Pera - Espátula - Embudo de separación - Papel filtro - Capilares - Cuba cromatográfica - Placa de sílica gel 	<p>Triturar la muestra sospechosa y colocar en un tubo de ensayo. Agregar 10mL de metanol y homogenizar. Filtrar y añadir 10mL de ciclohexano y homogenizar. Pasamos la mezcla a un embudo de separación donde se van a formar dos fases una apolar en la parte superior y una polar en la parte inferior, esta última la deseamos. Llevar a la estufa a una temperatura de 70°C y dejar que se evapore hasta 0,5mL.</p> <p>Realizar la aplicación tanto de testigos como de muestras a una distancia una de otra de 1,0 cm, con un capilar cargado con la disolución a 1,5 cm del borde inferior y de los bordes laterales de la placa. Se hace un toque, se evapora el solvente, se hace otro toque en el mismo lugar hasta lograr la concentración deseada y de deja secar a temperatura ambiente.</p>	<p>Factor de retención:</p> $R_f = \frac{\text{Dist. recorrida de la muestra}}{\text{Dist. recorrida del sist. de sol.}}$ <p>Dónde</p> <p>Rf = factor de retención</p> <p>El máximo valor de RF que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un RF entre 0.55 y 0.7.</p>

	<p>de reparto, la fase móvil "lavará" a los distintos componentes con diferente eficiencia, de modo que aquellos que "prefieren disolverse" en la fase móvil serán eluidos más rápido que los que sean preferencialmente solubles en la fase estacionaria.</p>		<p>Añadir el sistema de solventes a la cuba cromatográfica Ciclohexano:tulueno:dietilamina (75:15:10) hasta su saturación.</p> <p>La placa aplicada se introduce en la cuba y se deja que el solvente ascienda por capilaridad, hasta 2cm como máximo del borde superior. En este momento se retira la placa y se deja secar.</p> <p>Revelamos con luz ultravioleta (254nm y 366nm) la presencia de compuestos fluorescentes.</p> <p>Resultado: Luz UV: Manchas de abajo hacia arriba CBD anaranjado THC rojo cereza CBN rojo violáceo</p> <p>Revelamos con Sal de azul sólido B</p> <p>Resultados: Sal de azul sólido B: manchas marrones y violetas en las zonas donde se encuentren los cannabinoides.</p>	
--	--	--	--	--

	<p>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR):</p> <p>La espectroscopia infrarroja se fundamenta en que cuando la radiación infrarroja incide sobre una muestra, es capaz de provocar cambios en los estados vibracionales de las moléculas constituyentes de la misma. La absorción de radiación por parte de una muestra es indicativa del tipo de enlaces y grupos funcionales presentes en la misma.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mortero - Pistilo - Tubo de ensayo - Barrilla de agitación 	<p>Proceso para análisis de la muestra en el equipo:</p> <p>Triturar una pequeña cantidad de muestra sospechosa y colocar en un tubo de ensayo. Añadir cloroformo: metanol (1:1) y homogenizamos.</p> <p>Abrir el programa ChemID en el software y hacer correr el mismo. Clic en adquirir la muestra, clic adquirir la línea base.</p> <p>Aplicar en la parte del diamante una pequeña cantidad de la solución antes preparada.</p> <p>Observar los espectros de las frecuencias de grupo característicos para marihuana.</p> <p>Resultado: Positivo para <i>Cannabis sativa</i> si coinciden los picos del espectro con el del estándar de la muestra.</p>	
--	---	---	--	--

Fuente: Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de Chimborazo

3.3 Técnica para la validación del método de análisis

3.3.1 Especificidad

3.3.1.1 Procedimiento

- Analizar cinco muestras del solvente empleado para la preparación de las soluciones.
- Tomar cinco muestras que dieron positivo con pruebas presuntivas (testigos reactivos) y analizarlas.
- Analizar cinco estándares de concentración correspondiente al 99.93%.
- En caso de conocer los productos de degradación o impurezas presentes en la muestra preparar una solución con ellas y analizarla de acuerdo al procedimiento de análisis.

Degradación a temperatura térmica

- Preparar cinco soluciones estándar de Marihuana de concentración conocida correspondiente al 99.93%, someterla a 115°C y analizarla luego de 2 horas.

Especificaciones

- No deberá observarse picos significativos en el número de onda específico para marihuana en ninguno de los casos de especificidad analizados.
- Se sugiere para el análisis de este parámetro un mínimo de 20 muestras.

3.3.2 Límite de detección

3.3.2.1 Procedimiento

- Establecer el Límite de detección, analizando diferentes soluciones provenientes de la misma solución madre de 200mg con un estándar de marihuana de pureza del 99.93%, diluida en 50ml de agua destilada (grado de pureza absoluto), cada análisis se hará por sextuplicado.

Especificaciones

- Usar la solución estándar tan pronto sea preparada.

3.3.3 Precisión del método

3.3.3.1 Procedimiento

- Establecer la precisión del método analizando repetidamente una solución estándar, en un mismo laboratorio, por un mismo analista, usando el mismo equipo y en el mismo día. Se determinará en éste caso solamente las diferencias producidas por el método empleado.
- Preparar una solución estándar de concentración conocida y realizar 6 determinaciones cada una por sextuplicado.

Especificaciones

- Tomar en cuenta la pureza de estándar, en este caso 99,93%.
- El criterio de aceptación de la desviación estándar relativa no debe ser superior al 3,9% (Laboratorio de Química Forense)
- Para determinar la precisión se calcula la desviación estándar SD y la desviación estándar relativa RSD

3.3.4 Estabilidad

3.3.4.1 Procedimiento

- Preparar 6 soluciones estándar de concentración conocida recién preparados con testigos reactivos almacenados durante diferentes períodos de tiempo y en diferentes condiciones.

Especificaciones

- Cada determinación realizarla por sextuplicado.
- No deberá observarse picos significativos en el número de onda específico para marihuana en ninguno de los casos de estabilidad analizados.

CAPITULO IV

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis, interpretación y discusión de resultados

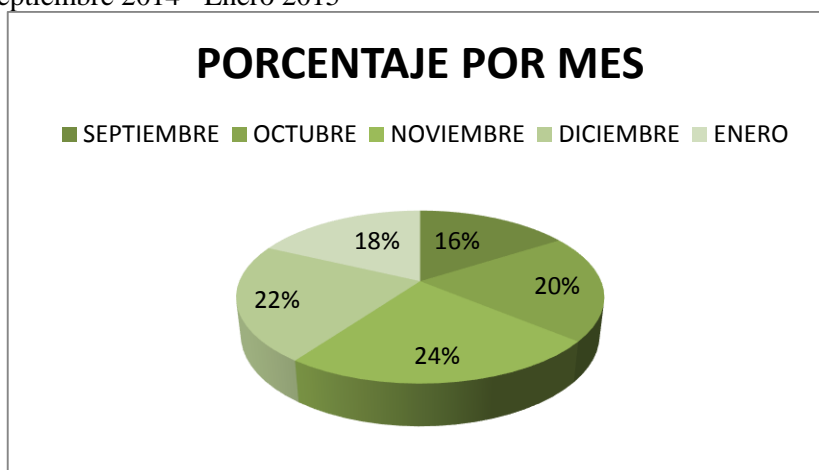
4.1.1 Muestras analizadas período Septiembre 2014 – Enero 2015

Tabla 1-4. Muestras de marihuana que ingresaron al Laboratorio de Química Forense durante el período Septiembre 2014 - Enero 2015

MES	FRECUENCIA	PORCENTAJE
SEPTIEMBRE	16	16%
OCTUBRE	19	20%
NOVIEMBRE	23	24%
DICIEMBRE	21	22%
ENERO	18	18%
TOTAL	97	100%

Fuente: Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de Chimborazo

Gráfico 1-4. Muestras de marihuana que ingresaron al Laboratorio de Química Forense durante el período Septiembre 2014 - Enero 2015



Realizado por: SÁNCHEZ, Gabriela.2015

Interpretación:

En la gráfica se puede observar que en los meses de Noviembre y Diciembre hubo un mayor número de ingreso de incautaciones de marihuana con un porcentaje de 24% y 22% respectivamente. Lo que podrían estar relacionados con diferentes factores tales como influencias sociales para la comercialización de este tipo de drogas.

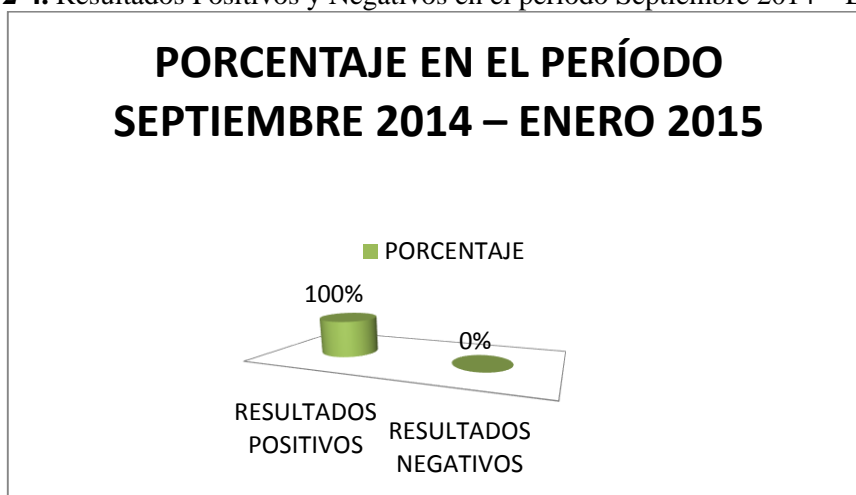
4.1.2 Pruebas presuntivas

Tabla 2-4. Resultados Positivos y Negativos en el período Septiembre 2014 – Enero 2015

MUESTRA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
RESULTADOS POSITIVOS	97	100%
RESULTADOS NEGATIVOS	0	0%
TOTAL	97	100%

Fuente: Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de Chimborazo

Gráfico 2-4. Resultados Positivos y Negativos en el período Septiembre 2014 – Enero 2015



Realizado por: SÁNCHEZ, Gabriela.2015

Interpretación:

Se realizan pruebas colorimétricas: Duquenois – Levine y Sal de azul sólido B confirmando la presencia de cannabinoides en las muestras mediante el cambio de color. Además la presencia de tricomas cistolíticos tras la observación microscópica.

Durante el período Septiembre 2014 - Enero 2015 al realizar los respectivos análisis a las diferentes muestras que ingresaron al Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de Chimborazo como sospechosas para marihuana se observa que las 97 muestras que ingresan dan positivo. Las mismas que provienen de las diferentes provincias pertenecientes a la zona 3.

4.1.3 Pruebas confirmatorias

Cromatografía en Capa Fina

Cuadro 1-4. Análisis de muestras por el ensayo de Cromatografía en Capa Fina

MUESTRA	Rf	CANNABINOIDES	RESULTADO
1	0.15	CBD	POSITIVO
	0.85	CBN	POSITIVO
2	0.13	CBD	POSITIVO
	0.3	THC	POSITIVO
3	0.14	CBD	POSITIVO
	0.5	THC	POSITIVO
	0.83	CBN	POSITIVO
4	0.13	CBD	POSITIVO
	0.39	THC	POSITIVO
	0.78	CBN	POSITIVO
5	0.15	CBD	POSITIVO
	0.29	THC	POSITIVO
	0.70	CBN	POSITIVO
6	0.15	CBD	POSITIVO
	0.95	CBN	POSITIVO
7	0.14	CBD	POSITIVO
	0.5	THC	POSITIVO
	0.9	CBN	POSITIVO
8	0.12	CBD	POSITIVO
	0.37	THC	POSITIVO
	0.9	CBN	POSITIVO
9	0.5	THC	POSITIVO
	0.7	CBN	POSITIVO
10	0.15	CBD	POSITIVO
	0.44	THC	POSITIVO

Realizado por: SÁNCHEZ, Gabriela.2015

Interpretación:

En la realización del ensayo se analizaron un total de 10 muestras sospechosas para Marihuana, dando como resultado todas positivas. Ya que con la ayuda del revelador se observó la presencia de manchas marrones y violetas en las zonas donde se encuentran los cannabinoides. Así mismo al realizar el cálculo de los Rf para cada una de las muestras tenemos que para la presencia de cannabidiol (CBD) debe ser entre 0.12 a 0.15, para Delta-9- tetrahidrocanabinol (THC) entre 0.3 a 0.5 y para cannabinoil (CBN) entre 0.7 a 0.9, sabiendo que el máximo valor de Rf que se puede alcanzar es de 1, pero lo ideal es que este entre 0.55 y 0.7. (ROYSTON, 1985, pág. 310)

4.2 Pruebas de hipótesis

4.2.1 Parámetros de Validación

4.2.1.1 Especificidad

Gráfico 3-4. Espectro de análisis de especificidad frente a los solventes utilizados, frente a la muestra testigo reactivo y frente al estándar.

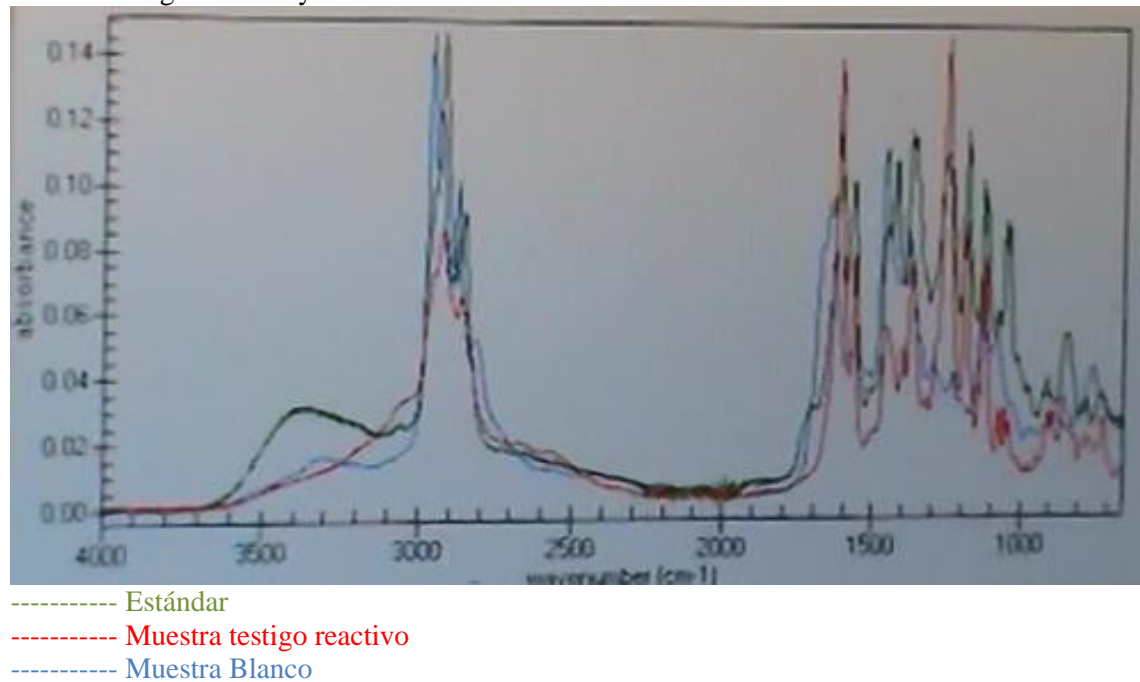
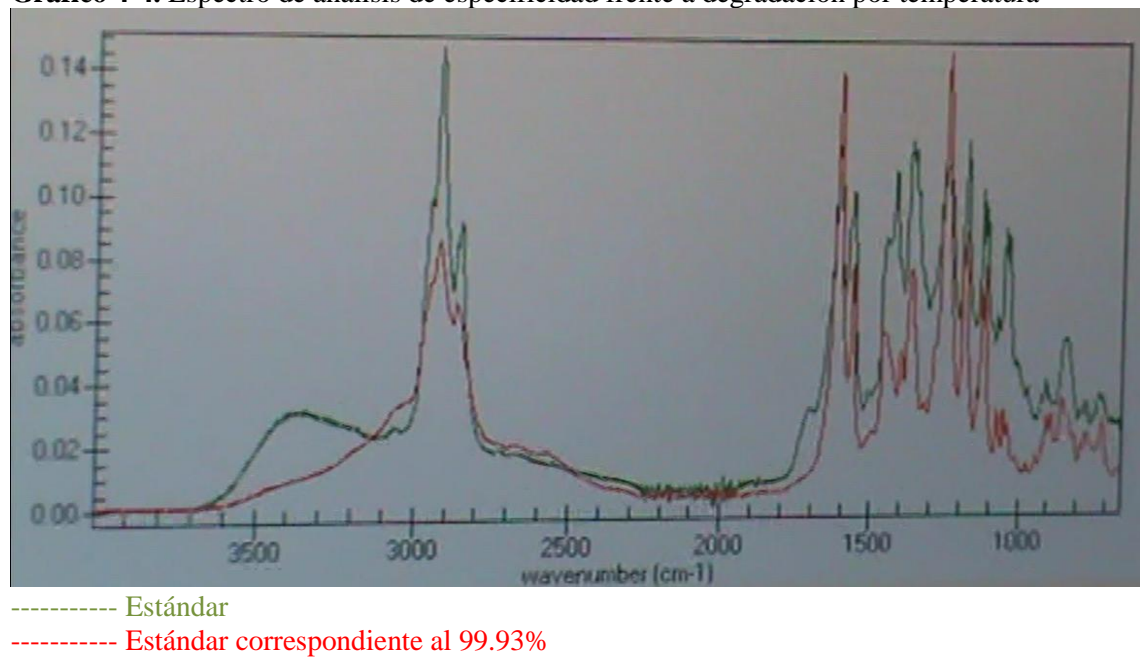


Gráfico 4-4. Espectro de análisis de especificidad frente a degradación por temperatura



Cuadro 2-4. Análisis de la Especificidad del método frente a los parámetros evaluados

Parámetro evaluado	Resultados
Interferencias encontradas con la muestra blanco de matriz	No presenta Interferencias
Interferencias encontradas con la muestra testigo reactivo	No presenta Interferencias
Interferencias encontradas con el estándar de concentración conocida	No presenta Interferencias
Interferencias encontradas por degradación térmica	No presenta Interferencias

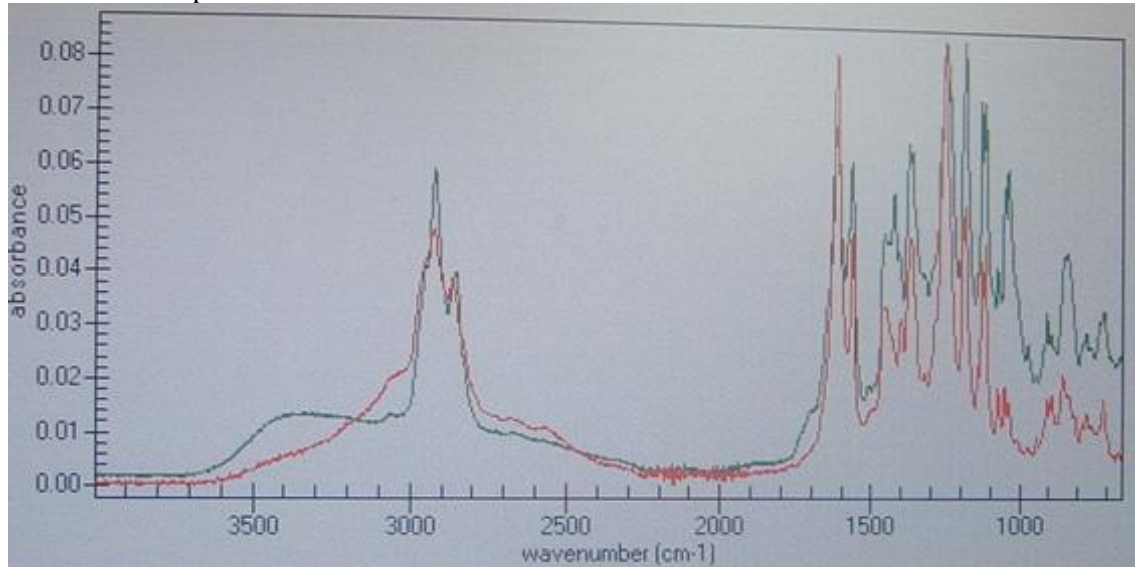
Realizado por: SÁNCHEZ, Gabriela.2015

En la gráfica 3-4 se observa el análisis de especificidad frente a los solventes utilizados (azul), frente a la muestra testigo reactivo (rojo) y frente al estándar (verde), los cuales no presentan interferencias en el número de onda de la región de las frecuencias de grupo característicos para cannabinoides. Como los alcanos C-H ($2850-2970\text{cm}^{-1}$), alcoholes O-H ($3200-3600\text{cm}^{-1}$), alquenos C=C ($1610-1680\text{cm}^{-1}$), anillos aromáticos C=C ($1500-1600\text{cm}^{-1}$).

En cuanto a la degradación térmica en la gráfica 4-4 se observa en la muestra que el pico del O - H desaparece en el número de onda de los alcoholes ($3200-3600\text{cm}^{-1}$) el cual no es significativo en relación al estándar de Marihuana. Por el contrario se intensifican los picos en $1610-1680\text{cm}^{-1}$ y $1500-1600\text{cm}^{-1}$. Lo que se puede predecir es que se da la formación de una insaturación por la eliminación de agua.

4.2.1.2 Límite de detección

Gráfico 5-4. Espectro de análisis del límite de detección



----- Estándar

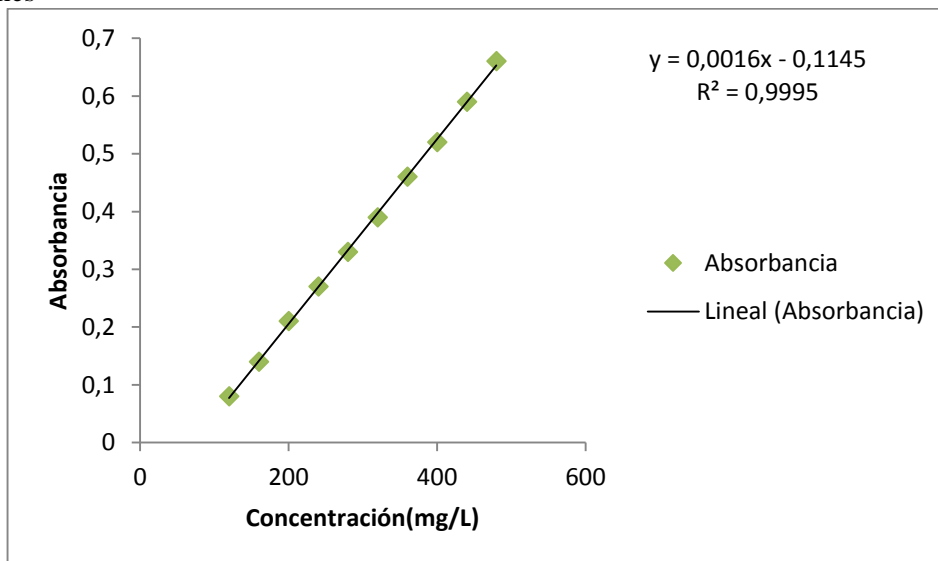
----- Muestra estándar diluida

Cuadro 3-4. Análisis del Límite de detección

Muestra	Alícuota	Volumen final	Concentración mg/L	Promedio Absorbancias
Dilución 1	3000µL	25mL	480	0,66
Dilución 2	2750µL	25mL	440	0,59
Dilución 3	2500µL	25mL	400	0,52
Dilución 4	2250µL	25mL	360	0,46
Dilución 5	2000µL	25mL	320	0,39
Dilución 6	1750µL	25mL	280	0,33
Dilución 7	1500µL	25mL	240	0,27
Dilución 8	1250µL	25mL	200	0,21
Dilución 9	1000µL	25mL	160	0,14
Dilución 10	750µL	25mL	120	0,08

Realizado por: SÁNCHEZ, Gabriela.2015

Gráfico 6-4. Curva de calibración entre las absorbancias y la concentración de cada una de las diluciones



Realizado por: SÁNCHEZ, Gabriela.2015

En el cuadro 3-4 vemos un proceso detallado donde se realizaron varias diluciones provenientes de una misma solución madre, de las cuales se calculó el promedio de las absorbancias y se determinó las concentraciones para cada alícuota. Cada análisis se lo hizo por sextuplicado. Dándonos como resultado que el límite de detección es 8.64mg/L de concentración del analito que puede detectar el equipo.

Se elaboró la curva de calibración para determinar el límite de detección, considerando que:

$$y_{LD} = a + 3 \cdot S_{y/x}$$

$$S_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{1/2}$$

$$y = bx + a$$

$$x = \frac{y \cdot a}{b}$$

$$x = 8,64 \text{ mg/L}$$

y_{LD} = respuesta al límite de detección

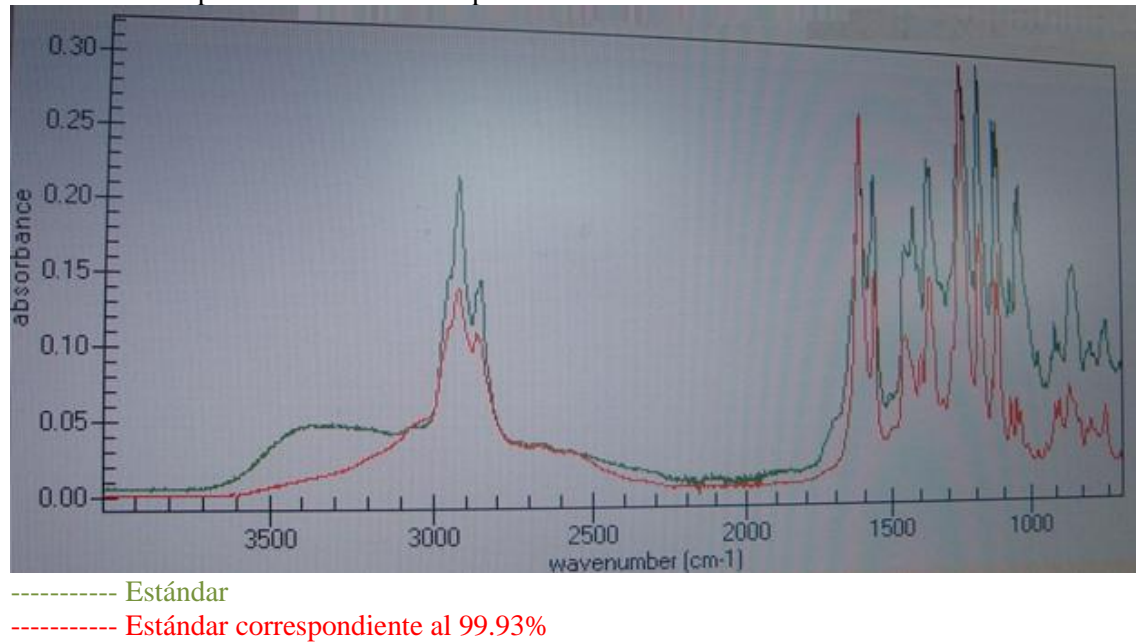
a = intercepta de la recta, obtenido por correlación lineal

$S_{y/x}$ = desviación estándar de la respuesta en relación a la concentración.

Por tanto niveles de concentración inferiores a 8,64mg/L no podrán ser utilizados para el análisis de identificación de los cannabinoides y que están por debajo del límite de detección del instrumento.

4.2.1.3 Precisión

Gráfico 7-4. Espectro de análisis de la precisión del método



Para la precisión, se tomó la lectura de las absorbancias del pico correspondiente a la vibración del anillo aromático ($1500-1600\text{cm}^{-1}$) que está presente en todos los cannabinoides. Cada análisis se lo hizo por sextuplicado tanto en lecturas como en muestras analizadas simultáneamente, se dan a conocer en el cuadro 4-4.

Cuadro 4-4. Análisis de la Precisión del método (repetibilidad): Absorbancias a (1500-1600cm⁻¹)

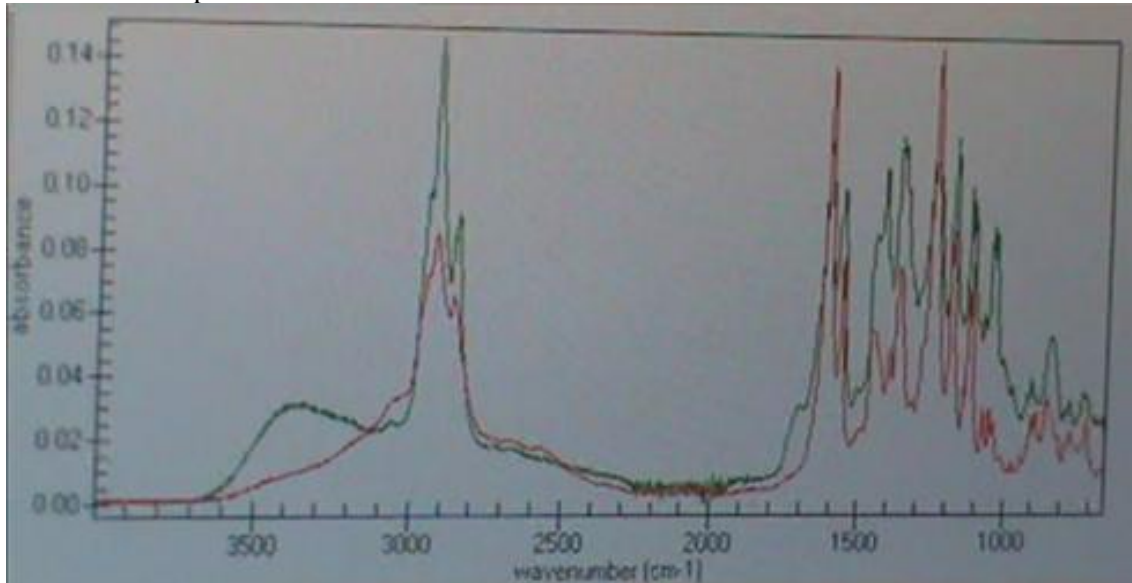
Muestra	Absorbancias						Promedio	DS
1	0,25	0,24	0,25	0,26	0,24	0,25	0,25	0,0075
2	0,25	0,27	0,25	0,26	0,28	0,26	0,26	0,012
3	0,27	0,28	0,27	0,26	0,25	0,27	0,27	0,010
4	0,27	0,28	0,27	0,26	0,28	0,27	0,27	0,0075
5	0,25	0,26	0,26	0,27	0,25	0,26	0,26	0,0075
6	0,27	0,25	0,27	0,28	0,26	0,26	0,27	0,010
Promedio							0,26	
DS							0,01	
RSD							4,40%	
Criterio de aceptación							RSD < 5%	

Realizado por: SÁNCHEZ, Gabriela.2015

Podemos observar que se analizaron 6 muestras provenientes de la misma solución estándar utilizada para la valoración de marihuana de pureza de 99.93%. El valor obtenido para la RSD fue 4.40% el cual está por debajo del valor de referencia de 5% en lo establecido por el Laboratorio de Química Forense, lo que indica que el método tiene una buena repetibilidad.

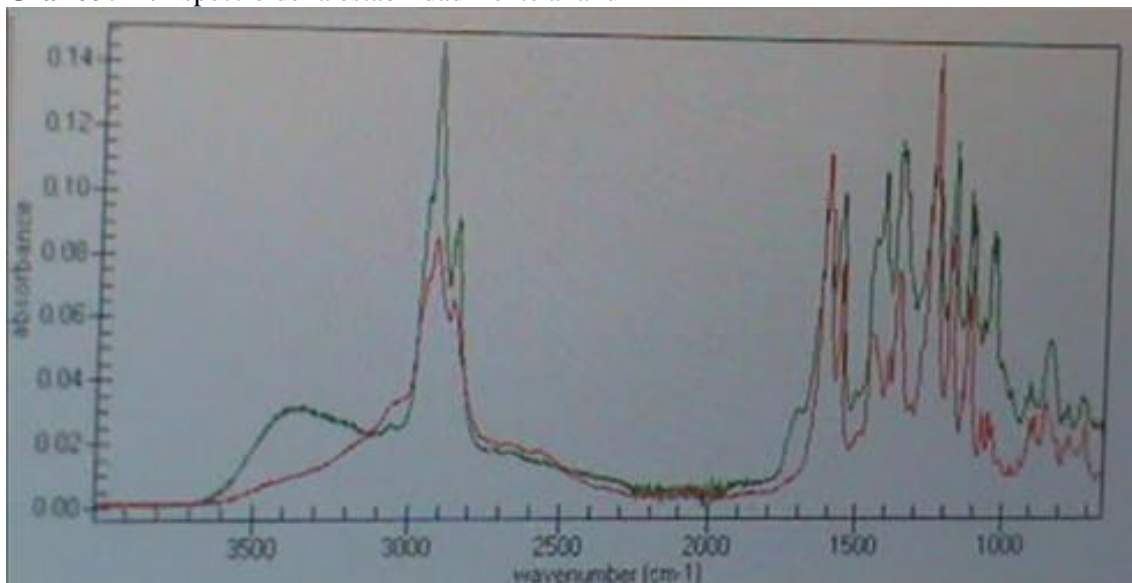
4.2.1.4 Estabilidad

Gráfico 8-4. Espectro de la estabilidad frente a la obscuridad



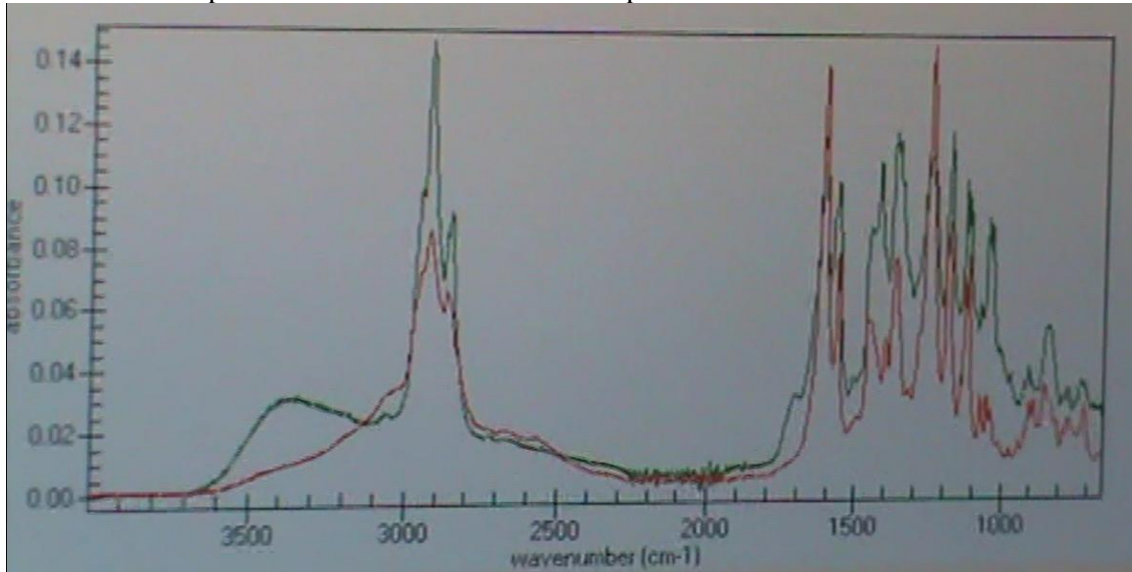
----- Estándar
----- Muestra testigo reactivo

Gráfico 9-4. Espectro de la estabilidad frente a la luz



----- Estándar
----- Muestra testigo reactivo

Gráfico 10-4. Espectro de la estabilidad frente a temperatura ambiente



----- Estándar
 ----- Muestra testigo reactivo

Cuadro 5-4. Análisis de la Estabilidad

Muestra	Tiempo	Condiciones
1	24 Horas	Sin luz
2	24 Horas	Con luz
3	24 Horas	A temperatura ambiente
4	720 Horas	Sin luz
5	720 Horas	Con luz
6	720 Horas	A temperatura ambiente

Realizado por: SÁNCHEZ, Gabriela.2015

Se analizaron 6 muestras estándar de concentración conocida con testigos reactivos que fueron almacenados en diferentes períodos de tiempo de 24 a 720 horas, al igual que en distintas condiciones de almacenamiento como en presencia de luz, en la oscuridad y a temperatura ambiente. Al evaluar los espectros de las muestras para estabilidad se observa que los picos analizados no interfieren en ninguno de los casos en el número de onda específicos para los cannabinoides.

4.3 Presentación de resultados

Cuadro 6-4. Análisis de resultados de los parámetros de pruebas de hipótesis

Parámetros	Resultados
Especificidad	No presenta interferencias
Límite de detección	8.64mg/L Mínima concentración del analito que puede detectar el equipo.
Precisión	El valor obtenido para la desviación relativa fue de 4.40% el cual está por debajo del valor de referencia del 5%, lo que indica que el método tiene una buena repetibilidad.
Estabilidad	Las muestras testigo reactivo que fueron almacenados en distintas condiciones. No interfieren en ninguno de los casos.

Realizado por: SÁNCHEZ, Gabriela.2015

CONCLUSIONES

- Al analizar experimentalmente los parámetros de las pruebas de hipótesis para la determinación de marihuana, se pudo comprobar que el equipo infrarrojo cumple con los requerimientos para los que fue diseñado, debido a que los resultados fueron satisfactorios para todos los análisis, para el límite de detección se obtuvo 8.64mg/L de concentración mínima del analito que puede detectar el equipo. En cuanto a la precisión del método se obtuvo un RSD de 4,40% por debajo de 5% que está dentro del criterio de aceptación. Además no se sobreponen las muestras analizadas en los picos característicos para marihuana, al igual que al someter a las muestras a diferentes condiciones y tiempos no existen picos que se interponen con los propios para cannabinoides.
- Se pudo identificar la presencia de grupos delta-9-tetrahidrocarbocannabinol debido a que el equipo infrarrojo es capaz de establecer los grupos funcionales propios de los cannabinoides. Además ayuda a comparar con detalle las muestras sospechosas para marihuana, con los espectros de compuestos puros que contiene la biblioteca del equipo, en este caso es particularmente útil la región de la huella dactilar.
- Al realizar la cromatografía en capa fina se pudo comprobar que este es un método efectivo para la identificación de marihuana, ya que al realizar la técnica para este proceso se puede evidenciar los diferentes cannabinoides presentes en las diferentes muestras. Comparado con el Equipo Infrarrojo de transformada de Fourier que sirve para complementar el análisis, constatando en ambos casos la presencia de cannabinoides.

RECOMENDACIONES

- Se deben tomar todas las medidas de seguridad en el laboratorio para evitar posibles accidentes, además de ocupar los materiales exactos para cada tipo de análisis a realizar.
- Tener extremo cuidado al momento de preparar Sal de azul sólido B ya que es altamente tóxico, además de realizar el pesaje exacto ya que cualquier error podría no dar la coloración característica para la presencia de cannabinoides.
- Al momento de ocupar el equipo infrarrojo, se debe revisar por la parte posterior del equipo que la sílica gel no se encuentre en un tono rosado, en caso de estarlo se debe hacer un cambio de la misma.
- Al analizar las muestras en el infrarrojo se recomienda utilizar las muestras de marihuana diluidas en una solución. Ya que si el análisis se hace en muestra seca presentará mayores interferencias al momento de realizar el análisis.
- Cuando se vaya a realizar el ensayo de cromatografía en capa fina, se deben utilizar muestras a las que previamente se les haya hecho una extracción de la clorofila, para que el momento del revelado no altere los colores que debe presentar.
- Al trabajar en el equipo infrarrojo se debe tener en cuenta que las ventanas que se ocupan en las celdas están hechas de cloruro de sodio, así que se debe evitar el contacto con compuestos acuosos ya que podrían diluir las celdas.

BIBLIOGRAFÍA

ASHTON, C. Pharmacology and effects of cannabis. *The British Journal of Psychiatry*. Vol. 10.1192. 01 February 2001, United States, 178: 101-106.

CONSEJO NACIONAL DE CONTROL DE SUTANCIAS ESTUPEFACIENTES Y PSICOTROPICAS (COSEP), 2010.

http://www.cicad.oas.org/fortalecimiento_institucional/eng/National%20Plans/ECUADOR%202009-2012.pdf

2015/02/21

DEGENHARDT, L., et al. Toward a global view of alcohol, tobacco, cannabis, and cocaine. *Plos Med*. Vol. 10.1016. 12 December 2012, United States, 5:1053–1067.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods. a laboratory guide to method validation and related topics, 1998.

EURACHEM/CITAC. Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry, 2002.

<http://www.european-accreditation.org/publication/citac-eurachem-ta>

2014/10/21

GELWICKS, J. Guideline for Validation of Analytical Methods, 2003.

<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>

2015/01/ 24

GROTENHERMEN, F. The toxicology of cannabis and cannabis prohibition. *Chem Bio divers*. Vol. 7. 25 June 2007, USA, pp. 1744-1769.

GROTENHERMEN, F. Pharmacokinetics and pharmacodinamycs of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet*. Vol. 3. 03 April 2003, USA, pp. 327–360.

HALL, W., & DEGENHARDT, L. Adverse health effects on non–medical cannabis use. *The Lancet*. Vol. 375. 16 January 2010, UK, pp. 1383-1391

HALL, W., & DEGENHARDT, L. The association between psychosis and problematic drug use among Australian adults: findings from the National Survey of Mental Health and Well Being. *Psychol Med.* Vol. 300. 14 February 2001, UK, pp. 659-668

INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA (ISP). Guía técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos, 2010.

http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%201%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf.

2014/08/10

ISO/ICE 17025:1999. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, 2000.

JENKE, R. Chromatographic Method Validation. A review of Current Practices and Procedures. I. General Concepts and Guidelines. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* Vol. 19. 30 May 1996, USA, pp. 719-736.

MONITORING THE FUTURE SURVEY (MFS), 2008.

<http://drugabuse.gov>

2015/01/03

NAKAMOTO K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. 1997

http://www.ecured.cu/index.php/Espectro_infrarrojo

2015/02/11

NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE (NIH). 2014.

<http://www.drugabuse.gov/es/publicaciones/drugfacts/la-marihuana-es-un-medicamento>

2015/01/12

NATIONAL SURVEY ON DRUG USE AND HEALTH (NSDUH), 2008.

<https://nsduhweb.rti.org/respweb/homepage.cfm>

2014/11/16

PICHAR, E. Trace Analysis: A structural approach to obtaining reliable results. 2.ed., Cambridge-Inglaterra. Royal Society of Chemistry. 1996, pp. 32-39.

RICHARD, H., et al. Laboratory detection of marijuana use: experience with a photometric immunoassay to measure urinary cannabinoids. *The JAMA Network*. Vol. 139. 01 November 1985, USA, pp. 1093-1096.

ROYSTON, Roberts., et al. Modern experimental organic chemistry. 4.ed, Orlando – Florida. Copyright. 1985, p.310.

SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR THE ANALYSIS OF SEIZED DRUGS (SWGDRUG), 2008.

<http://www.swgdrug.org/>

2014/09/03

SKOOG, Douglas., et al. Principios de análisis instrumental. 6.ed., D.F. – México. Cengage Learning Editores. 2008, pp. 430-477

THOMPSON, M. & WOOD, R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. Vol. 65. 13 March 1993, GreatBritain, pp. 2123-2144.

UNODC. World drug report 2008. Viena: United Nations Office on Drugs and Crime, 2007.

UNODC. Orientaciones para la implantación de un sistema de gestión de la calidad en los laboratorios de análisis de drogas, ST/NAR/37, 2009.

UNODC. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos, ST/NAR/41, 2009.

U.S PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2002

<http://www.usp.org/es/estandares-de-referencia>

2015/01/27

ANEXOS

Anexo A. Cadena de Custodia

<i>Toma de Muestra</i>	
	
<i>Verificación de la descripción de las muestras</i>	
	

Fuente: Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de Chimborazo

Anexo B. Modelo de hoja de la Cadena de Custodia

Fecha:		Hora
Número de informe, Noticia u oficio de otra autoridad:		
Zona: 3	Subzona: 6	Distrito:
Unidad Policial/ Centro de Acopio receptor:		
Ubicación Física en el Centro Acopio/ Bodega de Evidencias:		
Descripción del embalaje utilizado en el almacenamiento		
N° de Indicios:	N° de Bolsas:	N° de Cajas:
N° de Estantería:	N° de Fila	N° de Columna:
Ubicación en caja fuerte del centro de acopio:		
Fiscalía:		Juzgado:
Delito que se investiga:	Presunto Autor u Ofendido:	

DATOS DEL INDICIO/ EVIDENCIA/ BIEN INCAUTADO

Lugar del Hecho			
Tipo de Indicios- Evidencias- Bien:			Número:
Embalaje utilizado:		N° de Serie:	Marca:
Estado:		Regular:	Malo:
Color:	Tamaño:	Volumen:	Peso:
Tiempo estimado de caducidad o deterioro:			No perecible:
Naturaleza del indicio			
Orgánico:		Inorgánico:	

RESPONSABLE DE LA CADENA DE CUSTODIA

QUIÉN ENTREGA	QUIEN RECIBE
GRADO, NOMBRES Y APELLIDOS:	GRADO, NOMBRES Y APELLIDOS:
C.C.	C.C
TELF:	TELF:
FIRMA DE RESPONSABILIDAD	FIRMA DE RESPONSABILIDAD

Anexo C. Análisis del Límite de detección

Estadísticas de la regresión		R	tcal.	ttab.
Coefficiente de correlación múltiple	0,999748528	0,999748528	126,0966183	2,30600414
Coefficiente de determinación R²	0,99949712		Ho: No hay correlación Ha: Hay correlación	tcal>ttab
R² ajustado	0,99943426			
Error típico	0,004605662			
Observaciones	10			

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,337280303	0,337280303	15900,3571	1,74906E-14
Residuos	8	0,000169697	2,12121E-05		
Total	9	0,33745			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
<i>Intercepción</i>	-0,114545455	0,004072348	-28,12761616	2,7569E-09	-0,123936307	-0,105154602
<i>Concentración(mg/L)</i>	0,001598485	1,26767E-05	126,0966183	1,7491E-14	0,001569252	0,001627717

Análisis de los residuales

		Yi-Ŷ	(Yi-Ŷ)^2
Observación	Pronóstico Absorbancia	Residuos	
1	0,077272727	0,00272727	7,43802E-06
2	0,141212121	-0,0012121	1,46924E-06
3	0,205151515	0,00484848	2,35078E-05
4	0,269090909	0,00090909	8,26446E-07
5	0,333030303	-0,0030303	9,18274E-06
6	0,396969697	-0,0069697	4,85767E-05
7	0,460909091	-0,0009091	8,26446E-07
8	0,524848485	-0,0048485	2,35078E-05
9	0,588787879	0,00121212	1,46924E-06
10	0,652727273	0,00727273	5,28926E-05
		S y/x	0,004605662

$$y_{LD} = a + 3 \cdot S_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{1/2}$$

$$y = bx + a$$

$$x = \frac{y \cdot a}{b}$$

$$x = 8,64 \text{ mg/L}$$