



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

“VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA LA DETERMINACIÓN DE CANNABINOIDES EN MUESTRAS INCAUTADAS QUE INGRESARON EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA FORENSE DEL DEPARTAMENTO DE CRIMINALÍSTICA DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO”

Previo a la Obtención del Título
BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA

AUTOR
HEREDIA BALLADARES ESTEFANÍA GABRIELA

RIOBAMBA – ECUADOR

2015



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

“VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA LA DETERMINACIÓN DE CANNABINOIDES EN MUESTRAS INCAUTADAS QUE INGRESARON EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA FORENSE DEL DEPARTAMENTO DE CRIMINALÍSTICA DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO”

Previo a la Obtención del Título
BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA

AUTOR: HEREDIA BALLADARES ESTEFANÍA GABRIELA
TUTOR: DR. CARLOS PILAMUNGA

RIOBAMBA – ECUADOR
2015

DEDICATORIA

La concepción de este proyecto está dedicado a DIOS y a mis queridos Padres Carlos Heredia y Mercedes Balladares pilares fundamentales de mi vida ya que ellos han sido mi fortaleza para culminar esta etapa porque creyeron en mí y me enseñaron con ejemplos la perseverancia y superación, gracias porque hoy puedo alcanzar mi sueño de convertirme en Bioquímica Farmacéutica.

Estefanía Heredia

AGRADECIMIENTO

A mis padres quienes han motivado mi formación académica, creyeron en mí en todo momento y me brindaron su cariño y comprensión a lo largo de mi transcurso universitario.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia por darme todos estos años los conocimientos y formación académica.

Al Departamento de Criminalística por haberme permitido realizar mi presente trabajo de Investigación

A mis amigos por las largas noches de estudio que compartieron conmigo

Estefanía Heredia

**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 CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA LA DETERMINACIÓN DE CANNABINOIDES EN MUESTRAS INCAUTADAS QUE INGRESARON EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA FORENSE DEL DEPARTAMENTO DE CRIMINALÍSTICA DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO”** de responsabilidad de la señorita egresada Estefanía Gabriela Heredia Balladares, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Carlos Pilamunga
DIRECTOR DE TESIS

BQF. Victor Guangasig
MIEMBRO DE TRIBUNAL

NOTA DE TESIS

Yo, **Estefanía Gabriela Heredia Balladares**, 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

ESTEFANÍA GABRIELA HEREDIA BALLADARES

ÍNDICES

INDICE GENERAL	
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE GRÁFICOS	
INDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
INTRODUCCIÓN	

INDICE GENERAL

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Situación Problemática	1
1.2. Formulación del Problema	1
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 2: MARCO TEORICO	4
2.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación	4
2.2. El laboratorio de química forense del departamento de criminalística de Chimborazo.	4
2.3. Validación	5
2.4. Antecedentes de la investigación	6
2.5. Bases Teóricas	7
2.5.1. <i>El Cannabis</i>	7

2.5.2.	<i>Composición</i>	8
2.5.3.	<i>Métodos para determinar Cannabinoides</i>	11
2.5.4.	<i>Métodos cromatográficos</i>	11
2.5.4.1.	<i>Cromatografía de gases</i>	12
2.5.5.	<i>Cromatógrafo de gases</i>	13
2.5.6.	<i>Descripción del Cromatógrafo de gases</i>	13
2.5.6.1.	<i>Fase móvil.</i>	14
2.5.6.2.	<i>Fase estacionaria.</i>	15
2.5.6.3.	<i>Sistema de inyección.</i>	17
2.5.6.4.	<i>Horno y columna del Cromatógrafo.</i>	18
2.5.6.5.	<i>Columnas de relleno</i>	18
2.5.6.6.	<i>Columnas capilares</i>	19
2.5.6.7.	<i>Sistema de detección</i>	19
2.5.6.8.	<i>Sistema de registro de datos.</i>	22
2.5.7.	<i>Fundamentos teóricos</i>	22
2.5.7.1.	<i>Teoría de los platos</i>	22
2.5.7.2.	<i>Teoría cinética de la cromatografía</i>	24
2.5.7.3.	<i>Teoría para las columnas capilares</i>	25
2.6.	<i>Validación</i>	26
2.6.1.	<i>Aplicabilidad</i>	27
2.6.2.	<i>Exactitud</i>	27
2.6.3.	<i>Incertidumbre</i>	28
2.6.4.	<i>Linealidad</i>	28
2.6.5.	<i>Límite de detección (ID)</i>	28
2.6.6.	<i>Límite de cuantificación (LQ)</i>	28
2.6.7.	<i>Material de referencia</i>	28

2.6.8.	<i>Precisión</i>	29
2.6.9.	<i>Precisión intermedia</i>	29
2.6.10.	<i>Rango de trabajo</i>	29
2.6.11.	<i>Repetibilidad</i>	29
2.6.12.	<i>Reproductibilidad</i>	29
2.6.13.	<i>Robustez</i>	30
2.6.14.	<i>Selectividad</i>	30
2.6.15.	<i>Valor verdadero</i>	30
2.6.16.	<i>Valor verdadero convencional</i>	30
2.6.17.	<i>Veracidad</i>	30
2.6.18.	<i>Verificación</i>	30
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA		31
3.1.	Materiales, Equipos y Reactivos	31
3.1.1.	<i>Material de Estudio</i>	31
3.1.2.	<i>Materiales y Equipos</i>	31
3.1.3.	<i>Reactivos</i>	32
3.2.	Métodos y Técnicas de Análisis	33
3.2.1.	<i>Pruebas presuntivas</i>	33
3.2.2.	<i>Identificación de marihuana mediante el microscopio</i>	34
3.2.3.	<i>Identificación de marihuana mediante la Prueba Colorimétrica Sal de Azul Solido B</i>	35
3.2.4.	<i>Identificación de marihuana mediante la Prueba Colorimétrica DUQUENOIS – LEVINE</i>	36
3.2.5.	<i>Extracción de marihuana mediante muestras biológicas.</i>	37
3.2.6.	<i>Pruebas Confirmatorias</i>	38

3.2.6.1.	<i>Determinación de Cannabinoides por Cromatografía en Capa Fina</i>	38
3.2.6.2.	<i>Pruebas previas al análisis</i>	39
3.2.6.3.	<i>Determinación de marihuana mediante el Método de Cromatografía de Gases</i>	40
3.2.7.	<i>Validación</i>	41
3.2.7.1.	<i>Preparación de Estándares previa calibración</i>	42
3.2.7.2.	<i>Condiciones previas del equipo</i>	43
3.2.7.3.	<i>Comprobación de cromatografías</i>	44
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		45
4.1.	Análisis, interpretación y discusión de resultados	45
4.1.1.	<i>Pruebas presuntivas</i>	46
4.1.2.	<i>Pruebas confirmatorias</i>	47
4.1.2.1.	<i>Cromatografía en capa fina</i>	47
4.2.1.	<i>Selectividad</i>	48
4.2.2.	<i>Linealidad</i>	49
4.2.3.	<i>Sensibilidad</i>	53
4.2.4.	<i>Límites</i>	54
4.2.5.	<i>Exactitud</i>	56
4.2.6.	<i>Precisión</i>	56
4.2.7.	<i>Robustez</i>	58
4.2.8.	<i>Aplicabilidad</i>	62
5.	CONCLUSIONES	64
6.	RECOMENDACIONES	66

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

UNODC	Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito
A.C.	Antes de cristo
THC	Tetrahidrocanabinol
CBD	Canabidiol
CBN	Cannabiniol
ECD	Detector de captura de electrones
TCD	Detector de conductividad térmica
AED	Detector de emisión atómica
PID	Detector de fotoionización
FID	Detector de ionización de llama
PFD	Detector fotométrico de llama
TID	Detector termoiónico
m	Metros
cm	Centímetros
mm	Milímetros
µm	Micrometros
g	Gramos
ppm	Partes por millón
%	Porcentaje
L	Litros
mL	Mililitros
µL	Microlitros
psi	Libra-fuerza por pulgada cuadrada
h	Hora
min.	Minutos
s.	Segundos
I	Índice de retención
T _r	Tiempo de retención corregido
Z	Número de átomos
N	Número de platos teóricos
L	Es la longitud del empaque de la columna.
H	Altura del plato teórico

Tr	Tiempo de retención de un compuesto
Trr	Tiempo de retención relativo
Tm	Tiempo muerto
W	Ancho del pico a media altura
A	Difusión aparente
B	Coficiente del término debido a la difusión molecular
C	Coficiente del término debido a la resistencia a la transferencia de muestra
U	Velocidad lineal en un punto de la columna
H	Viscosidad del gas
Dp	Gradiente de presión de un elemento
Dz	Longitud de columna
K	Constante de permeabilidad.
B	Base
H	Altura
K'	Constante de capacidad
N	Numero de platos teóricos
W	Ancho
Rs	Resolución
x	concentración del analito
y	respuesta
a	intercepto
b	valor de la pendiente
R	Coficiente de correlación
S	Desviación estándar
%CV	Porcentaje de variación
%CVh	Porcentaje de variación de horwitz
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1-1.	Clasificación científica	7
Cuadro 2-1.	Estado físico de las fases	12
Cuadro 3-1.	Tipos de fases estacionarias	15
Cuadro 4-1.	Descripción de Split/Splitless	18
Cuadro 5-1.	Características de un detector	20
Cuadro 6-1.	Características del FIT	22
Cuadro 7-1.	Consideraciones de la Teoría para las columnas capilares	25
Cuadro 8-1.	Características de validación de los distintos tipos de pruebas recomendadas.	27

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. <i>Validación de materiales incautados según la UNODC</i>	6
Tabla 1-4. Muestras analizadas durante el periodo de investigación	45
Tabla 2-4. Parámetros cromatográficos	48
Tabla 3-4. Concentración de estándar y la relación de áreas del ST/STI	49
Tabla 4-4. Estadística de la regresión lineal	52
Tabla 5-4. Análisis de los residuales	52
Tabla 6-4. Análisis de los residuales	55
Tabla 7-4. Análisis de varianzas test de Fisher.....	58
Tabla 8-4. Análisis de los residuales	59
Tabla 9-4. Prueba de Youden y Steiner	59
Tabla 10-4. Análisis con respecto a la Prueba de Youden y Steiner	60
Tabla 11-4. Prueba de Youden y Steiner	62
Tabla 12-4. Presentación de resultados de la validación	63

INDICE DE GRAFICOS

Grafico 1-4.	Muestras analizadas durante el periodo de investigación	45
Grafico 2-4.	Curva de calibración de la Relación de áreas con los diferentes Estándares Vs. La Concentración.....	50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1.	Estructura química del THC según la numeración monoterpenoide	9
Figura 2-1.	Cannabinol	9
Figura 3-1.	Cannabidiol	9
Figura 4-1.	Cannabigerol	10
Figura 5-1.	Cannabiciclol	10
Figura 6-1.	Canabicromero	10
Figura 7-1.	Detector de ionización de flama.....	21
Figura 8-1.	Diagrama de tiempos de retención.....	23
Figura 9-1.	Diagrama de bandas cromatográficas.	24
Figura 1-4.	Cannabis vista a través del microscopio	46
Figura 2-4.	Prueba de Duquenois – Levine y Prueba de Sal Azul Sólido respectivamente	46
Figura 3-4.	Cromatografía en capa fina observada por luz UV a 254 y 366nm respectivamente.....	47

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Criminalística de la Provincia de Chimborazo con el propósito de validar el método de Cromatografía de Gases para determinar Cannabinoides (compuestos del *Cannabis*) proporcionando un sinnúmero de pruebas que garantizaron la reproducibilidad y confiabilidad de resultados. Primero se utilizó una solución madre de estándar puro y un estándar interno (Tetracosano) y se procedió a analizar los siguientes parámetros: La selectividad se analizó mediante el cálculo la resolución (RS) obteniendo valores mayores a 1,5, la linealidad se determinó mediante el coeficiente de variación r y r^2 es $\geq 0,999$ y un t-Student con $n-2$ grados de libertad a dos colas y $\alpha=0.05$ aceptando la H_1 que confirma que existe correlación lineal entre las variables, la sensibilidad se calculó mediante la pendiente, el límite de cuantificación fue $1,87378 \times 10^{-9}$, el rendimiento de 99,9994% y el error 0,0006%, la precisión se obtuvo mediante el coeficiente de varianza (%CV) y se aplicó el test de Fisher con 1 grado de libertad a una cola para el numerador y 6 grados de libertad para el denominador y $\alpha=0.05$, se acepta la H_0 demostrando que no existe varianzas significativas en los datos, para determinar la robustez de un sistema se aplicó la prueba de Youden y Steiner.

Los resultados del análisis demostraron que el método es apropiado para la determinación de Cannabinoides además que las variables del equipo como la temperatura y el volumen de inyección no deben ser modificadas porque alteran los resultados de manera significativa.

PALABRAS CLAVE:

<VALIDAR> < CUANTIFICACIÓN > <CROMATOGRAFÍA DE GASES> < RESULTADOS CONFIABLES > < RESULTADOS REPRODUCIBLES> <COMPUESTOS DEL CANNABIS> <DROGAS>

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Situación Problemática

En nuestro país la posesión ilegal de drogas y estupefacientes es un delito penado por la ley sin embargo se acepta ciertos límites permitidos por lo cual es importante conocer la cantidad de droga incautada, esta investigación se centra en la droga conocida como *Cannabis* la cual es permitida en casos de terapia en una cantidad no mayor a 10 gramos.

La cromatografía de Gases es el método más utilizado para la determinación de esta droga por lo tanto se necesita validarlo para que el departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo obtenga un mejor desempeño en su trabajo y que garantice resultados confiables.

1.2. Formulación del Problema

En las primeras etapas de desarrollo de investigación es necesario realizar los diversos estudios de validación para asegurar que los resultados obtenidos sean confiables,

evitando que existan errores que podrían perjudicar a los implicados en la posesión de drogas.

Muchos investigadores se centran en la especificidad, linealidad, exactitud y estudios de precisión de drogas; aplicando pruebas presuntivas las cuales nos orientan acerca de la presencia o ausencia de la sustancia en cuestión para aplicar después pruebas confirmatorias que aseguren su presencia además de cuantificar los diversos Cannabinoides que se presentan en las muestras analizadas.

1.3. Justificación teórica

La confiabilidad en los análisis de laboratorio juega un papel decisivo en un proceso penal. Sí los resultados obtenidos no son fiables, se pueden producir errores al momento de dictaminar una sentencia por parte de los jueces.

Mediante la validación se puede asegurar que un método es adecuado para el propósito que ha sido diseñado, es decir, resolver un problema analítico particular, dando validez y confiabilidad de los resultados emitidos por el laboratorio.

La técnica que se utilizará para la determinación de estas sustancias ilícitas es la Cromatografía de Gases ya que es el procedimiento analítico más confiable y específico actualmente, recomendado por la comunidad científica internacional.

Por tales razones, este trabajo pretende establecer los parámetros de validación para la técnica instrumental de Cromatografía de Gases, para el análisis de Cannabinoides encontradas en muestras sólidas incautadas, en el Laboratorio de Química Forense del Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

El fin de obtener datos de alta calidad, por medio del uso de mediciones analíticas que sean precisas, confiables y adecuadas.

1.4. Justificación práctica

La Cromatografía de Gases es uno de los métodos más utilizados dentro del departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo debido a que ofrece resultados en un periodo de tiempo relativamente corto y adecuado para la determinación de drogas tanto en forma cuantitativa como cualitativa

Es por esto que se necesita que todos los resultados obtenidos sean confiables debido a que cualquier error puede ocasionar problemas judiciales, es por esto que se debe validar el método y así tener un respaldo de que el trabajo realizado en el Laboratorio de Química Forense de la Provincia de Chimborazo es afectivo para el propósito dado.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Validar del método de cromatografía de Gases para determinar la presencia de Cannabinoides en muestras incautadas

1.5.2. Objetivos específicos

- Determinar cuantitativamente los grupos delta-9- tetrahidrocannabinol presentes en muestras incautadas, establecidas por el método de Cromatografía de Gases
- Establecer experimentalmente los valores de los parámetros como selectividad, linealidad, sensibilidad, límites (límite de detección y de cuantificación), exactitud, precisión, robustez y aplicabilidad con el fin de establecer un comprobable grado de confianza para el análisis
- Comprobar que el método de Cromatografía de Gases es efectivo y factible para determinar Cannabinoides presentes en muestras incautadas.

CAPÍTULO II

MARCO TEORICO

2.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación

2.2. El laboratorio de química forense del departamento de criminalística de Chimborazo.

Es una institución pública que presta sus servicios en el campo de la Química Forense a toda la población de la ciudad de Riobamba y la provincia de Chimborazo atendiendo sus necesidades buscando fomentar la investigación de los futuros profesionales que allí se forman.

El departamento del Laboratorio de Química Forense de esta Institución, está encargada de la investigación de los diferentes tóxicos y drogas que se pueden encontrar en las múltiples muestras biológicas y no biológicas que al ingresar al organismo de un ser vivo van a producir severas alteraciones e incluso la muerte del individuo y así determinar la causa y el agente causal de la intoxicación de la persona

2.3. Validación

La validación de los métodos analíticos junto con la calibración del equipo son elementos trascendentales de la garantía de calidad de los laboratorios, es por esto que los métodos utilizados en un laboratorio de química forense del departamento de Criminalística deben ser evaluados y sometidos a pruebas para asegurarse de que los resultados sean válidos y coherentes con el objetivo previsto. (UNODC, 2010)

Todos los métodos nuevos que se introduzcan en un laboratorio deben estar además documentados, y todos los analistas que los vayan a utilizar han de recibir una formación adecuada y demostrar su competencia en su utilización antes de empezar a actuar en casos concretos.

La validación o la verificación de un método se realizan mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión, etc. El proceso que ha de seguirse para ello debe constar por escrito como procedimiento normalizado de trabajo.

Si un método se modifica o se aplica en una situación nueva (por ejemplo, una muestra de matriz nueva) se necesitará una revalidación o una verificación, según el alcance de la modificación y el carácter de la nueva situación.

Los sistemas expuestos en la bibliografía pueden variar de las presentes directrices en algunos aspectos porque la validación depende necesariamente del uso predicho. Una de las ventajas de estas directrices es que se ocupan en exclusiva del análisis cualitativo y cuantitativo de sustancias estupefacientes sometidas a fiscalización que se encuentren en materiales incautados o especímenes biológicos. (UNODC, 2010,)

El objetivo de la validación de un proceso es demostrar la capacidad de proporcionar, de forma continuada y reproducible, productos homogéneos de acuerdo a unas especificaciones de calidad. La validación transita por cuatro etapas o fases que son: la

calificación de diseño, calificación de la instalación, calificación de la operación, y calificación del desempeño. (CECMED, 1994)

2.4. Antecedentes de la investigación

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, entre otros (SWGDRUG, 2008.)

Tabla 1-1. Validación de materiales incautados según la UNODC

2.9.2 Materiales incautados – Análisis cuantitativo (continuación)

Parámetro	Requisitos para la validación	Criterios para la aprobación
Recuperación (si se necesita una extracción)	Preparar muestras del analito con tres niveles de concentración en una matriz típica. Háganse cinco réplicas de los extractos de cada muestra. Al mismo tiempo analícese las soluciones estándar del analito de que se trate. La recuperación se calcula a continuación comparando las respuestas espectroscópicas del analito, por ejemplo, las absorciones, con las de los patrones. Recuperación % = $[A1/A2] \times 100$. Para cada muestra utilizada para la extracción: A1 = respuesta del analito A2 = respuesta del patrón.	La recuperación debe ser reproducible con un margen de $\pm 15\%$. Nota: como se indica en la Parte II, el porcentaje de recuperación absoluta no es fundamental en la medida en que sea reproducible y el límite bajo de cuantificación sea adecuado.
Incertidumbre	Estimar los errores en cada etapa del proceso analítico utilizando los datos de la validación, si se dispone de ellos, y calcular la incertidumbre total (véase el apartado 2.6. de la Parte II).	Como orientación general, la incertidumbre debe situarse en una banda de $\pm 15\%$ del límite de cuantificación; $\pm 10\%$ del rango medio o alto.
Especificidad/selectividad	Como en el análisis cualitativo	Como en el análisis cualitativo
Límite de cuantificación	Analizar, una sola vez, diez muestras en blanco extraídas de una matriz típica de la droga que contengan ésta en concentraciones próximas al nivel mínimo (cercano al límite de cuantificación) en el que puede percibirse una señal que indique su presencia. Expresar el límite de cuantificación como desviación estándar de ± 3 o ± 10 del valor de la muestra en blanco en la posición de la droga.	El límite de cuantificación debe ser adecuado para los fines previstos (es decir, de ser sometido a un control de calidad externo, debe permitir el cumplimiento de los objetivos de calidad que correspondan).

Continuará...

Continúa...

Linealidad y rango de trabajo*	Analizar una muestra en blanco y otras seis muestras en blanco preparadas independientemente que contengan la droga de interés en seis concentraciones distintas distribuidas en intervalos iguales a lo largo del rango de interés.	El rango de trabajo debe permitir la obtención de los resultados previstos.
Precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad	Analizar diez muestras en blanco preparadas independientemente y añadidas con la droga de interés en seis concentraciones distribuidas a intervalos iguales dentro del rango de trabajo y expresar la variación en términos de desviación estándar de cada concentración.	La desviación estándar de los controles de concentraciones bajas debe ser inferior al 20% y la de los controles de otros niveles debe ser inferior al 15%.
Exactitud	Analizar diez muestras en blanco preparadas independientemente y añadidas con la droga de interés en tres niveles de concentración distintos (alto, medio y bajo) y expresar la diferencia entre el resultado medio y el resultado esperado en porcentaje.	Los errores en los controles de concentraciones bajas han de ser inferiores al 20% y en los demás controles inferiores al 15%.

Fuente: UNODC (2010)

Entre las operaciones ordinarias de mantenimiento cabe mencionar los controles del septum, el sistema de inyección, las presiones del gas y los filtros internos, el nivel de la señal de base y el ruido de fondo.

2.5. Bases Teóricas

2.5.1. El Cannabis

Cuadro 1-1. Clasificación científica

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Urticales
Familia	Cannabaceae
Género	Cannabis

Realizado por: Estefanía Heredia
Fuente: Datos tomados de Marshall (2012)

El *Cannabis* comúnmente conocida como “Marihuana” es una planta anual y es una hierba dioica, es decir las flores masculinas y femeninas se encuentran en distintas plantas, aunque hay alguna excepción. Las plantas masculinas o estaminadas son por lo general más altas pero menos robustas que las femeninas o pistiladas. Los tallos son erectos y pueden variar desde 0,2 m. hasta 6 m. Sin embargo, la mayoría de las plantas alcanzan de 1-3 m de alturas. La falta de ramificación, como la altura de la planta, depende de factores ambientales y hereditarios así como del método de cultivo.

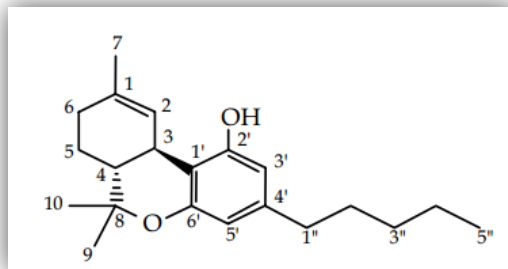
Microscópicamente la *Cannabis* presenta pelos tectores curvados aislados o formando parte de la epidermis similares a una uña de gato. Algunos de ellos pueden estar engrosados en la base con cristales de carbonato cálcico (cistolitos). Las brácteas (el órgano foliáceo en la proximidad de las flores y diferente a las hojas normales y las piezas del perianto) de la inflorescencia femenina poseen abundantes pelos secretores con pie pluricelular pluriseriado y cabeza globulosa constituida por 8-16 células. (LINEO Carlos, 1753)

2.5.2. Composición

Existen un sinnúmero de variedades de *Cannabis* pero se conocen principalmente la *Indica*, *Sativa*, *Rudelaris*, *Spontanea* y *Kafiristanca*; su principal diferencia es la proporción de Cannabinoides que presentan en su composición Sin embargo los efectos varían de acuerdo a cada organismo debido a su composición inestable y al origen de cultivo de cada planta.

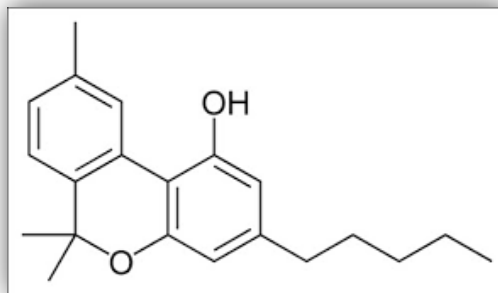
La *Cannabis* está compuesta de aproximadamente 400 sustancias químicas diferentes, 60 de las cuales están estructuralmente relacionadas con la sustancia psicoactiva Tetrahidrocanabinol delta-9 o THC, que es el principal psicoactivo de esta planta, entre las demás sustancias se encuentran Canabidiol CBD, Cannabiniol CBN y en mínimas cantidades Cannabigerol, Cannabicromero, Cannabicicol. (PGR, 1998)

Figura 1-1. Estructura química del THC según la numeración monoterpenoide



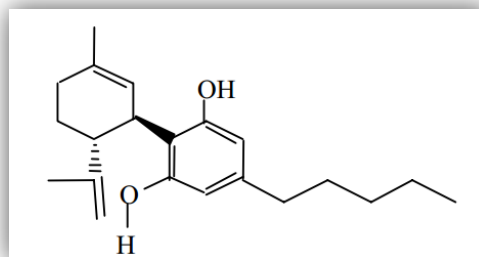
Fuente: Datos tomados de Grotenhermen (2003)

Figura 2-1. Cannabinol



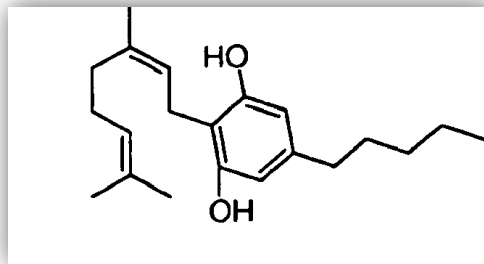
Fuente: Datos tomados de Grotenhermen (2003)

Figura 3-1. Cannabidiol



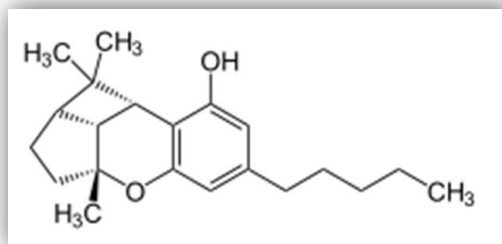
Fuente: Datos tomados de Grotenhermen (2003)

Figura 4-1. *Cannabigerol*



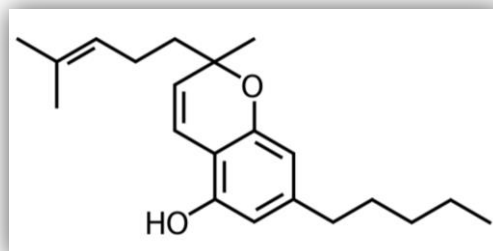
Fuente: Datos tomados de Grotenhermen (2003)

Figura 5-1. *Cannabicitrolol*



Fuente: Datos tomados de Grotenhermen (2003)

Figura 6-1. *Canabicromero*



Fuente: Datos tomados de Grotenhermen (2003)

2.5.3. Métodos para determinar Cannabinoides

- *Examen microscópico*
- *Espectrofotometría uv/visible*
- *Inhibición de la hemaglutinación*
- *Espectrofotometría de absorción atómica*
- *Identificación fotográfica*
- *Pruebas colorimétricas*

2.5.4. Métodos cromatográficos

La cromatografía cuyo significado es “Escribir en colores” es un método cualitativo de análisis que permite separar a los diversos componentes que se presentan en una muestra basado en dos fenómenos la adsorción (en la cual la moléculas, iones o átomos son retenidos formando una película en la superficie de un cuerpo) y la absorción (en la que sustancias son atraídas por un líquido logrando que las asimilen) .

En dependencia de las velocidades con que se mueven los componentes a través de dos fases una móvil que recorrerá arrastrando a ciertos componentes afines y otra estacionaria que retendrá a los demás componentes dependiendo de sus tasas de migración (IUPAC) logrando así una identificación, aislamiento o separación clara y definida según el tipo de cromatografía que se emplee.

Cuando la muestra se presenta como un material de característica vegetal, seco y triturado, resulta dificultoso el reconocimiento de adulterantes procedentes de otras especies vegetales, o del estiércol de ganado, sobre todo cuando la muestra se encuentra prensada. (WADE DT, 2003)

Cuadro 2-1 Estado físico de las fases

ESTADO FISICO DE LAS FASES			
		FASE MÓVIL	
		Líquida	Gaseosa
		Cromatografía líquida	Cromatografía de gases
FASE ESTACIONARIA	Sólida	Cromatografía líquido-sólido	Cromatografía gas-sólido
	Líquida	Cromatografía líquido-líquido	Cromatografía gas-líquido

Realizado por: Estefanía Heredia

2.5.4.1. Cromatografía de gases

Es una técnica analítica que aporta información tanto cualitativa como cuantitativa, se basa en la separación de los diversos componentes por el fenómeno de partición en la cual la muestra se volatiliza y se transporta por la fase móvil hacia la columna cerrada en la que se encuentra presente la fase estacionaria y la respuesta es medida por el tiempo de retención.

Cabe destacar que existe una afinidad entre la muestra tanto en fase móvil como en fase estacionaria. (BARQUERO Miriam, 2006.)

Las ventajas de la Cromatografía de Gases son que posee detectores universales, un sin número de aplicaciones, métodos sencillos, rápidos, efectivos e inclusive económicos comparado con otras cromatografías como HPLC

La temperatura es una desventaja y limitante durante el análisis como en los compuestos pocos volátiles cuyo peso molecular supera a 300 u.m.a., compuestos sensibles a cambios de temperatura y compuestos muy poco volátiles que por lo general se encuentran en forma iónica. (BLGO. Andrés, 2006)

Se puede diferenciar dos tipos de Cromatografía de Gases la cromatografía gas-sólido (GSC) cuya fase estacionaria es sólida y el proceso se fundamenta en la adsorción la cual no es lineal por lo que provoca una retención semipermanente del analito y picos con colas delimitando así a este análisis para muestras con peso molecular bajo más presenta coeficientes de distribución mucho mayores

Se utiliza más ampliamente tenemos a la cromatografía gas-líquido (GLC) que presenta una fase estacionaria líquida inmóvil en la superficie de un sólido inerte; en estos tipos de Cromatografía la fase móvil es un gas portador. (BARQUERO Miriam, 2006)

2.5.5. Cromatógrafo de gases

Un Cromatógrafo de gases es un equipo complejo que permite la detección de los diferentes componentes de una muestra permitiendo un flujo constante de la fase móvil, volatilizar a la muestra e introducirla en la corriente de gas portador, mantener la longitud apropiada de la fase estacionaria y la temperatura de la columna así como detectar los componentes de acuerdo a los tiempos de retención proveyendo una respuesta clara. (MCNAIR Harold, 1998)

2.5.6. Descripción del Cromatógrafo de gases

El Cromatógrafo de Gases consta de los siguientes elementos:

- Fase móvil.
- Fase estacionaria.
- Sistema de inyección.
- Horno y columna del Cromatógrafo.
- Sistema de detección
- Sistema de registro de datos.

2.5.6.1. Fase móvil.

Esta fase es generalmente un gas, líquido o un fluido supercrítico (es un híbrido entre un líquido y un gas) que no afectan la separación debido a que no interfieren en los procesos de sorción (la agrupación de compuestos químicos de manera disuelta o gaseosa), desorción (la eliminación de compuestos químicos desde un medio adsorbente) o partición que se producen en la columna,

Principalmente se utilizan Argón, Helio, Dióxido de Carbono o Nitrógeno dependiendo del tipo de detector sin embargo el gas utilizado afecta en la altura del plato como se explicara posteriormente,

Las fuentes más utilizadas son cilindros de alta pureza o en su defecto eliminar las impurezas que puedan afectar la respuesta del detector que se pueden administrar a una presión adecuada y constante.

Puede estar almacenado en balas normales o mediante un generador, regulado por un sistema de manómetros ubicados a la entrada y salida del generador que controlan el flujo constante regulado mediante un rotámetro (medidor de caudal de área variable y de caída de presión constante.) o un medidor de pompas de jabón y finalmente un tamiz molecular que puede actuar como deshidratador del gas.

Para evitar la interferencia de las impurezas principalmente hidrocarburos, agua, CO, etc. muchos dispositivos poseen trampas a la entrada del gas sin embargo poseen una capacidad limitada (BARQUERO Miriam, 2006 .).

La fase móvil tiene dos finalidades claras; el transportar los componentes de la muestra sin discriminaciones y el acondicionar una matriz apropiada para el detector para este fin debe cumplir ciertos parámetros:

- Inerte tanto con los componentes de la muestra como con los de la fase estacionaria
- Minimizar la dispersión gradual de un gas en otro
- Elevada pureza

- Económico
- Disponible
- Compatible con el detector a utilizar

2.5.6.2. Fase estacionaria.

La fase estacionaria es aquella que interacciona con los componentes de la muestra, por lo general se encuentra entrelazada o entrecruzada impidiendo así la pérdida durante el lavado o elución, en la Cromatografía Gas-Sólido está representada por un sólido de aluminio, carbón, sílica gel o tierra de diatomeas interaccionando por equilibrios de adsorción gaseosa, filtración sobre geles porosos o intercambio iónico.

Cromatografía Gas-Líquido debe ser de baja viscosidad y alta diferencia de solubilidad interaccionando con la fase móvil por reparto. Es fundamental además considerar la polaridad del analito al momento de seleccionar la fase estacionaria (BARQUERO Miriam, 2006)

Cuadro 3-1. Tipos de fases estacionarias

TIPOS DE FASES ESTACIONARIAS		
	Utilización	Ejemplos
No polares	Separan sustancias poco o nada polares	Gomas de silicona OV-1, OV-101 o SE-30
Ligeramente polar	Selectividad para mezclas mixtas	Sebacato de dietil, aceite de silicona, gomas de silicona
Polaridad media o alta	No aptos para hidrocarburos no aromáticos	Aceite de Ucon LB-550X, polifenil éter, Carbowax 1 540, succinato de butanodiol

Realizado por: Estefanía Heredia
Fuente: Datos tomados de Skoog (2001)

Al momento de elegir la Fase Estacionaria se debe tener en cuenta ciertas condiciones como:

- Adherencia para que sea arrastrada por la fase móvil
- Amplio rango de temperatura aproximadamente de -60 y 400 °C
- Baja presión de vapor
- Baja viscosidad dependiendo de la muestra y las condiciones en que se trabaje
- Baja reactividad (menor a 100°C) mayor que la temperatura máxima del horno
- Inerte
- Mojar completamente el soporte
- Selectiva
- Termoestable

Cabe destacar que no existe una fase estacionaria que cumpla con todos los requisitos antes mencionados sin embargo en separaciones a temperaturas elevadas se recomienda la utilización de polimeros líquidos con elevado peso molecular que proporciona una respuesta confiable.

El tiempo de retención del soluto depende de su coeficiente de distribución, punto de ebullición y solubilidad el cual está relacionado con la naturaleza química de los componentes y cabe destacar que deben ser significativos y no demasiado grandes ya que pueden producir separaciones incompletas y tiempos de retención relativamente cortos o prolongados. (MCNAIR Harold, 1998)

En la investigación se utiliza trifluoropropilmetil polisiloxano como fase estacionaria que resuelve compuestos imposibles de resolver con fases de fenilo y ciano, sobresalientes en estabilidad térmica y bajo sangrado y adecuadas para utilizar con detectores sensibles.

Los polisiloxanos constituyen las fases estacionarias más comunes. Hay una enorme variedad disponible y son estables, sólidos y versátiles. Los polisiloxanos estándar se caracterizan por una estructura repetitiva de siloxano. Cada átomo de silicio contiene dos grupos funcionales.

El tipo y el porcentaje de sustitución de los grupos son los factores que permiten diferenciar cada fase estacionaria y sus propiedades. Presenta las siguientes características:

- 100% dimetilpolisiloxano
- Apolar
- Excelente columna de uso general
- Amplia gama de aplicaciones
- Bajo sangrado
- Alto límite de temperatura
- Ligadas y entrecruzadas
- Lavable con disolvente
- Disponible en un amplio rango de dimensiones de columna
- Equivalente a la fase USP G2
- Fases similares: SPB-1, Rtx-1, BP-1, OV-1, OV-101, 007-1(MS), SP-2100, SE-30, ZB-1, AT-1,MDN-1, ZB-1.(AGILENT J&W, 2010, pp 77)

2.5.6.3. Sistema de inyección.

El sistema de inyección de muestra es aquel que permite comunicar al gas portador con la muestra, este se encuentra localizado a la entrada de la columna.

Se recomienda una inyección directa y rápida evitando la presencia de aire para obtener mejores resultados se fundamenta en la inyección mediante una jeringa hipodérmica a través de una pared que divide completa o incompletamente una estructura denominado septum, a un alineador de vidrio contenido en un bloque metálico barriendo y vaporizando a la muestra de manera instantánea.

La temperatura debe ser de 10° a 50°C mayor a la temperatura de la columna (SKOOG Douglas, 1994)

Cuadro 4-1. Descripción de Split/Splitless

Descripción	Unidad	Referencia
Kit de sello con recubrimiento de oro, incluye arandela 5188-5367		5188-5367
	10/paq.	5190-2209
Sello con recubrimiento de oro con cruz*		5182-9652
Sello de acero inoxidable		18740- 20880

Realizado por: Estefanía Heredia
Fuente: Agilent Technologies (2013)

2.5.6.4. Horno y columna del Cromatógrafo.

El horno no es más que el compartimento en el cual se deposita la columna cromatográfica, el cual controla que la temperatura sea constante y que se pueda calentar y enfriar rápidamente.

Para conseguir este efecto se necesita un sistema de flujo de aire el cual permita atravesar la resistencia de calentamiento, además en el interior del horno existen unos deflectores que reducen la resistencia del aire produciendo el efecto previamente mencionado.. (SKOOG Douglas, 1994)

2.5.6.5. Columnas de relleno

Las columnas de relleno o empacadas consisten en unos tubos de material inerte ya sea metal, vidrio, etc. Que contiene en el interior un material sólido, esférico y uniforme, finamente dividido asegurando una máxima superficie de interacción y una buena resistencia mecánica y recubierta con una capa de espesores.

Un aspecto importante es el tamaño de la columna debido a que a menor tamaño se presenta una mayor interacción y una mayor eficacia sin embargo se necesita que la presión sea adecuada y que no afecte a una columna demasiado pequeña de forma que para 50 psi de presión se necesita 250-149 μ m de diámetro de la columna (SKOOG Douglas, 1994)

2.5.6.6. *Columnas capilares*

Dentro de las columnas capilares tenemos las WCOT de pared recubierta con una fina capa de fase estacionaria y las SCOT de soporte recubierto con un material absorbente usualmente con tierra de diatomeas, además presentan mayor capacidad de carga

- Columnas clásicas de relleno
- Columnas capilares rellenas
- Columnas capilares de capa porosa

2.5.6.7. *Sistema de detección*

El Cromatógrafo de Gases posee un detector el cual es capaz de captar y medir los solutos en la corriente del gas portador transmitiendo la señal de salida del analito hacia el final de la columna y codificándola en una señal eléctrica la cual se amplifica y registra de forma adecuado para ser analizado por el operario, para esto debe poseer ciertas características:

Cuadro 5-1. Características de un detector

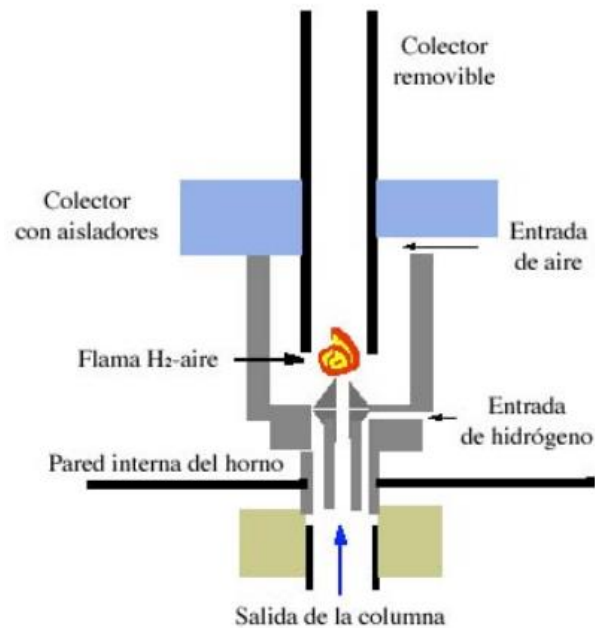
CARACTERISTICAS DE UN DETECTOR	
Sensibilidad	Es necesario que pueda determinar con precisión cuándo sale analito y cuando sale sólo el gas portador. Posee sensibilidades entre 10^{-8} y 10^{-15} g/s de analito.
Respuesta lineal al analito	Con un amplio rango de órdenes de magnitud
Tiempo de respuesta	Relativamente pequeño, independiente del caudal de salida.
Intervalo de temperatura de trabajo	Relativamente extenso
Estabilidad y reproducibilidad	A cantidades iguales de analito debe dar salidas de señal iguales.
Fiabilidad	Alta
Manejo	Factible, o a prueba de operadores inexpertos.
Respuesta	Lineal, semejante o selectiva para todos los analitos y altamente predecible para un reducido número de analitos.
No destructivo con la muestra	

Realizado por: Estefanía Heredia
 Fuente: Principios Y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases

A pesar de estas características es importante señalar que no existe un detector que cumpla con todas ellas y al momento de seleccionar el tipo de detector se debe analizar el tipo de muestras con las que se van a trabajar Algunos tipos de detectores se enlistan a continuación:

- Detector de captura de electrones (ECD)
- Detector de conductividad térmica (TCD)
- Detector de emisión atómica (AED)
- Detector de fotoionización (PID)
- Detector de ionización de llama (FID)
- Detector fotométrico de llama (PFD)
- Detector termoiónico (TID)

Figura 7-1. Detector de ionización de flama



Fuente: Datos tomado de Barquero (2006)

En nuestra investigación trabajamos con el detector de ionización de flama (FID), Este detector esta compuesto por una flama de hidrógeno/aire por donde transcurren las muestras que contienen carbono rompiendolas en moléculas y llevados por una placa colectora produciendo asi una señal electrica, originando una combustion que reduciendo el oxigeno aplicando una diferencia de potencial.

Es uno de los detectores mas aplicados, selectivo para un amplio rango de compuestos organicos y destructivo para las muestras dependiendo del flujo de masas (SKOOG Douglas, 1994)

Cuadro 6-1. Características del FIT

Descripción	D. i. de punta de jet	longitud (mm)	Referencia
Jets para conexiones capilares optimizadas			
Capilar	0,29 mm	42,8	G1531-80560
Capilar Optimizado para destilación simulada	0,47 mm	42,8	G1531-80620
Jets para conexiones adaptables			
Capilar	0,29 mm	61,5	19244-80560
Capilar Optimizado para destilación simulada	0,47 mm	61,5	19244-80620
Empaquetado	0,46 mm	63,5	18710-20119
Empaquetado, wide-bore	0,76 mm	63,5	18789-80070

Realizado por: Estefanía Heredia
Fuente: Agilent Technologies (2013)

2.5.6.8. Sistema de registro de datos.

Consiste en un sistema que convierte los resultados a lenguaje que pueda ser analizado por el operario, principalmente se utiliza para esto una computadora

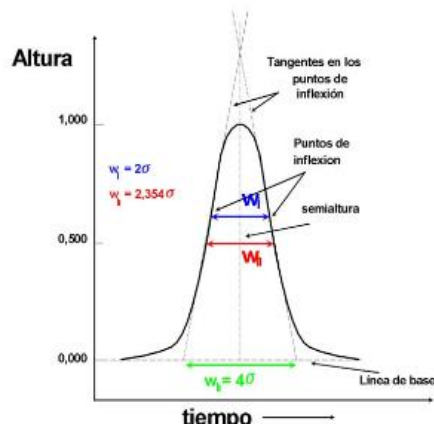
2.5.7. Fundamentos teóricos

2.5.7.1. Teoría de los platos

Martin y Synge establecieron la teoría de los platos teóricos definiéndolos como un conjunto de columnas horizontales y adyacentes y que en cada uno de ellos se establece un equilibrio de la fase móvil y la fase estacionaria, por lo que se mejora la eficacia al

aumentar el número de platos teóricos y en la cual la altura también representa también un factor importante. (BLGO Andrés, 2006)

Figura 8-1. Diagrama de tiempos de retención



Fuente: Datos tomado de Barquero (2006)

El principal inconveniente de esta teoría es el sinnúmero de suposiciones que se establecen como considerar el volumen de la fase estacionaria en cada placa constante y de igual forma el coeficiente de distribución, además de asegurar que el equilibrio de las dos fases en cada placa es constante e independiente de la concentración del soluto. (BLGO Andrés, 2006)

$$N = \frac{L}{H}$$

N= número de platos teóricos

L = es la longitud del empaque de la columna.

H = altura del plato teórico

$$N = 16 \left(\frac{tr}{w} \right)^2$$

N = número de placas teóricas

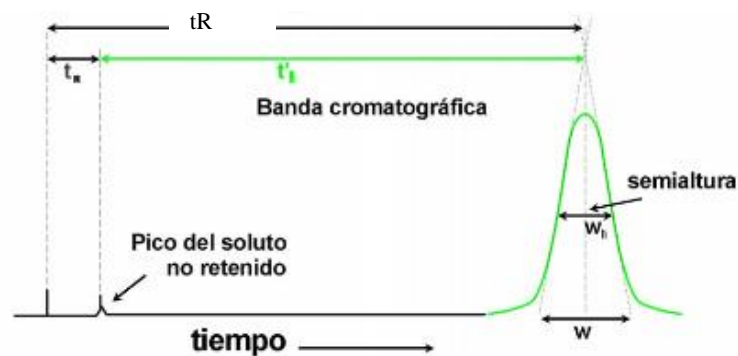
tr = tiempo de retención de un compuesto

w = ancho del pico a media altura

2.5.7.2. Teoría cinética de la cromatografía

Esta teoría explica el comportamiento cinético que ocurre dentro de la columna y el ensanchamiento de la banda con sus variaciones, así como la forma gaussiana típica, estos cambios pueden manifestarse debido a un mayor tiempo de contacto con las diversas fases produciendo una distribución simétrica de las velocidades en la que fluye la fase móvil, el ancho del pico además va a depender de la desviación estándar (BLGO Andrés, 2006)

Figura 9-1. Diagrama de bandas cromatográficas.



Fuente: Datos tomados de Wade (2003)

t_R = es el tiempo de retención para un soluto retenido por el empaque de la columna.

t_M = es el tiempo para uno.

El ensanchamiento de los picos se puede explicar por tres procesos: la difusión en remolino, la difusión longitudinal, y la transferencia de masa fuera del equilibrio; estos procesos a su vez están controlados como la velocidad de flujo, el tamaño de la partícula del material de empaque, las velocidades de difusión y el grosor de la fase estacionaria. Para explicar esto se ha establecido la ecuación de Van Deemter. (BLGO. Andrés, 2006)

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \qquad H = \frac{B}{u} + C_S u + C_M u$$

H = altura equivalente a una placa teórica, milímetros.

$$u = \frac{L}{t_r}$$

u = aire promedio de la velocidad lineal, cm/seg

$$A = 2\lambda dp$$

A= difusión aparente

$$B = 2\lambda Dm$$

B = coeficiente del término debido a la difusión molecular

$$C = \left(\frac{8}{\pi}\right) \left(\frac{k'}{1 + k'^2}\right) \left(\frac{df}{Ds}\right)$$

C = coeficiente del término debido a la resistencia a la transferencia de masas

2.5.7.3. Teoría para las columnas capilares

Cuadro 7-1. Consideraciones de la Teoría para las columnas capilares

CONSIDERACIONES	
La difusión aparente	No contribuye de manera apreciable al ensanchamiento de los picos en este tipo de columnas.
El coeficiente de la difusión molecular	Tiene un valor de uno debido a que la distancia que recorre la partícula es igual a la longitud de la columna.
La transferencia de masas	Está en función del diámetro de la columna y es más importante que el tamaño de partícula de relleno.

Realizado por: Estefanía Heredia
Fuente: Datos tomados de Wade (2003)

En este caso se parte de la ecuación de Van Deemter pero considerando el valor de A como despreciable.¹³ La ley de Darcy correlaciona la velocidad lineal de un gas que circula por una columna con la gradiente de presión. (WADE, 2003)

$$u = - \left(\frac{k}{\eta} \right) \left(\frac{dP}{dz} \right)$$

u = velocidad lineal en un punto de la columna

z = distancia a la entrada de la columna

η = viscosidad del gas

dP = gradiente de presión de un elemento

dz = longitud de columna

k = constante de permeabilidad.

2.6. Validación

La validación es un proceso mediante el cual se efectúa un seguimiento de parámetros que ratifiquen que los resultados obtenidos sean confiables y reproducibles, para esto se necesita un diseño experimental en el cual se plantee una hipótesis nula (H_0), otra alternativa (H_1) y un nivel de incertidumbre o una probabilidad de error (P), grados de libertad (gl).

Existen un sinnúmero de técnicas para validar un método dependiendo de sus características tenemos: (QUATTROCCHI O, 1992. pp. 29.-301)

Para validar un método sea cual fuere primero se establecen las condiciones que se deben cumplir ya sean físicas como el tipo de gas portador que se utilice, el flujo del mismo, el tipo de detector y las temperaturas de trabajo así como la rampa

Las condiciones químicas pueden ser principalmente la polaridad de la fase estacionaria y la selectividad

Las condiciones estadísticas como: selectividad, linealidad, sensibilidad, límites(valor crítico, límite de detección, límite de cuantificación) exactitud, precisión, robustez, aplicabilidad

Para asegurar que los resultados sea confiables se utiliza un Estándar con características conocidas y pureza elevada para calibrar el equipo y definir las condiciones apropiadas para el análisis y posteriormente evaluar los resultados obtenidos durante el análisis a las condiciones pre- establecidas.

Cuadro 8-1. Características de validación de los distintos tipos de pruebas recomendadas.

TIPO DE ANALISIS	IDENTIFICACION	CUALITATIVO	CUANTITATIVO
Exactitud	NO	NO	SI
Límite de Cuantificación	NO	NO	SI
Límite de Detección	NO	SI	NO
Linealidad	NO	NO	SI
Sensibilidad	NO	NO	SI
Precisión	NO	NO	SI
Rango	NO	NO	SI
Robustez	NO	NO	SI
Selectividad	SI	SI	SI

Realizado por: Estefanía Heredia
Fuente: UNODCS (2010)

2.6.1. Aplicabilidad

Se establece los analitos, y concentraciones para los cuales es aplicable satisfactoriamente un método el cual permitirá su correspondiente análisis de acuerdo a una norma pre- establecida.

2.6.2. Exactitud

Se define como exactitud a un sinnúmero de resultados cuyo valor obtenido en condiciones pre-establecidas se acerca al valor verdadero.

2.6.3. Incertidumbre

Se define a la incertidumbre como aquel nivel de desconfianza que existe en la determinación y obtención de resultados por el efecto de variables o errores.

2.6.4. Linealidad

Se define como un sinnúmero de resultados obtenido en condiciones preestablecidas proporcionales unos con otros.

2.6.5. Límite de detección (LD)

Es la concentración de un analito que puede ser detectada aunque no necesariamente cuantificada.

2.6.6. Límite de cuantificación (LQ)

Es la concentración mínima de un analito que es cuantificada con un tolerable nivel de incertidumbre.

2.6.7. Material de referencia

Se define como el material estable y homogéneo de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas las cuales han sido predeterminadas para su estudio.

2.6.8. Precisión

Se define como un sinnúmero de resultados obtenido en condiciones pre-establecidas los cuales se aproximan unos con otros.

2.6.9. Precisión intermedia

Se define como un sinnúmero de resultados obtenido en diferentes condiciones los cuales se aproximan unos con otros.

2.6.10. Rango de trabajo

Se define como un intervalo dentro de los cuales se aceptan validos los resultados obtenidos.

2.6.11. Repetibilidad

Es la precisión de resultados que se obtiene mediante la utilización del mismo procedimiento en las mismas condiciones de trabajo dentro de un mismo lugar de trabajo.

2.6.12. Reproductibilidad

Es la precisión de resultados que se obtiene mediante la utilización del mismo procedimiento en diferentes condiciones de trabajo en diferentes establecimientos con diferentes analistas y de acuerdo con sus particulares condiciones.

2.6.13. Robustez

Se define como la capacidad para mantener resultados inalterables a pesar de los diversos cambios que puedan ocurrir lo que produce una confianza de su uso.

2.6.14. Selectividad

Se define como la propiedad para analizar un analito en particular haciendo distinción de cualquier otro que se presente También se lo conoce como “Especificidad”.

2.6.15. Valor verdadero

Es un valor característico en condiciones pre establecidas .Para nuestra investigación no se lo conoce exactamente.

2.6.16. Valor verdadero convencional

Es un valor característico el cual puede sustituir al valor verdadero.

2.6.17. Veracidad

Es un parámetro que se calcula mediante el promedio de un sinnúmero de resultados y un valor verdadero medido.

2.6.18. Verificación

Se la define como la confirmación de que los resultados obtenidos sean verdaderos y de acuerdo a las condiciones específicas

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Materiales, Equipos y Reactivos

3.1.1. *Material de Estudio*

Muestras incautadas

3.1.2. *Materiales y Equipos*

- Mascarilla
- Mandil
- Cofia
- Guantes
- Gradilla
- Varillas de agitación
- Espátula
- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Balones aforados
- Vasos de precipitación
- Micro pipetas

- Matraces
- Micro jeringas
- Computadora
- Cámara Fotográfica
- Estufa
- Incubadora
- Balanza
- Cromatógrafo de Gases

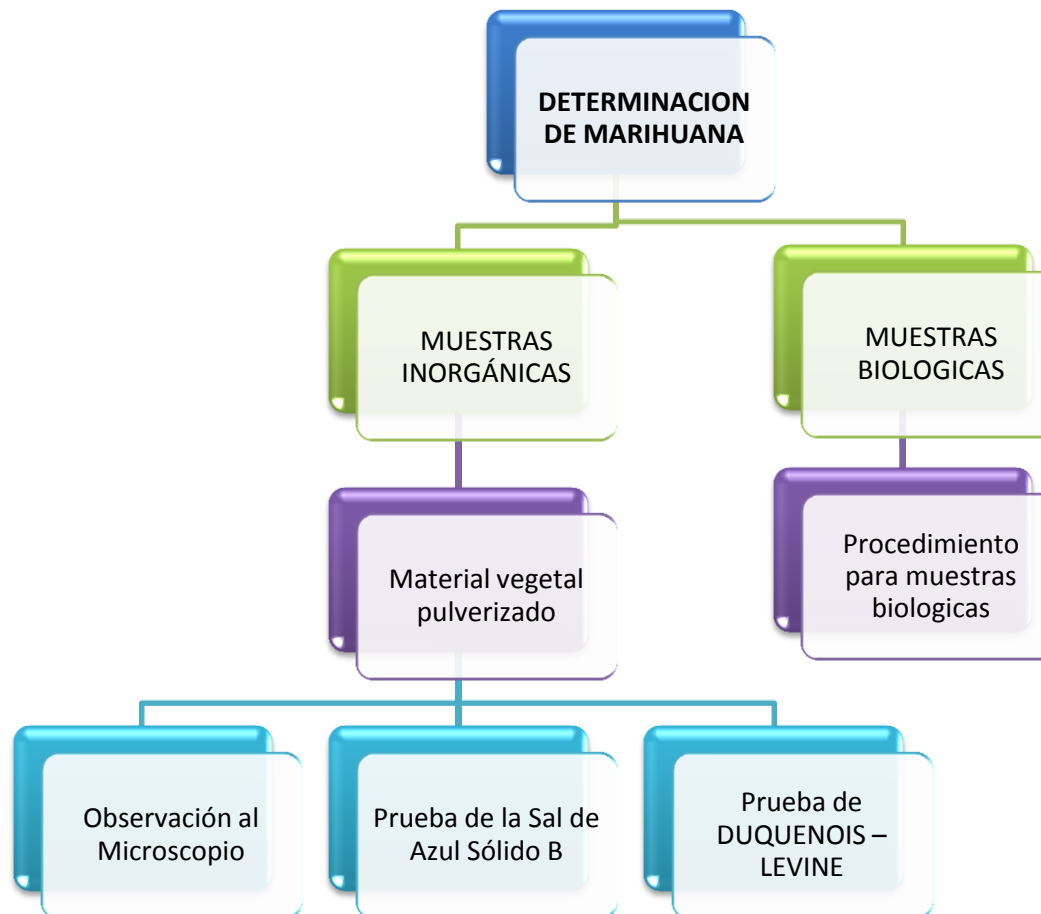
3.1.3. Reactivos

-
- Tetracosano (Estándar Interno)
- Ácido clorhídrico
- Acetato de etilo
- Acetaldehído
- Agua destilada
- Ciclohexano
- Cloroformo
- Etanol
- Hidróxido de sodio
- Hidróxido de potasio
- Metanol
- Sulfato sódico anhidro
- Reactivo de Duquenois Levine
- Reactivo de Sal Azul Solido B

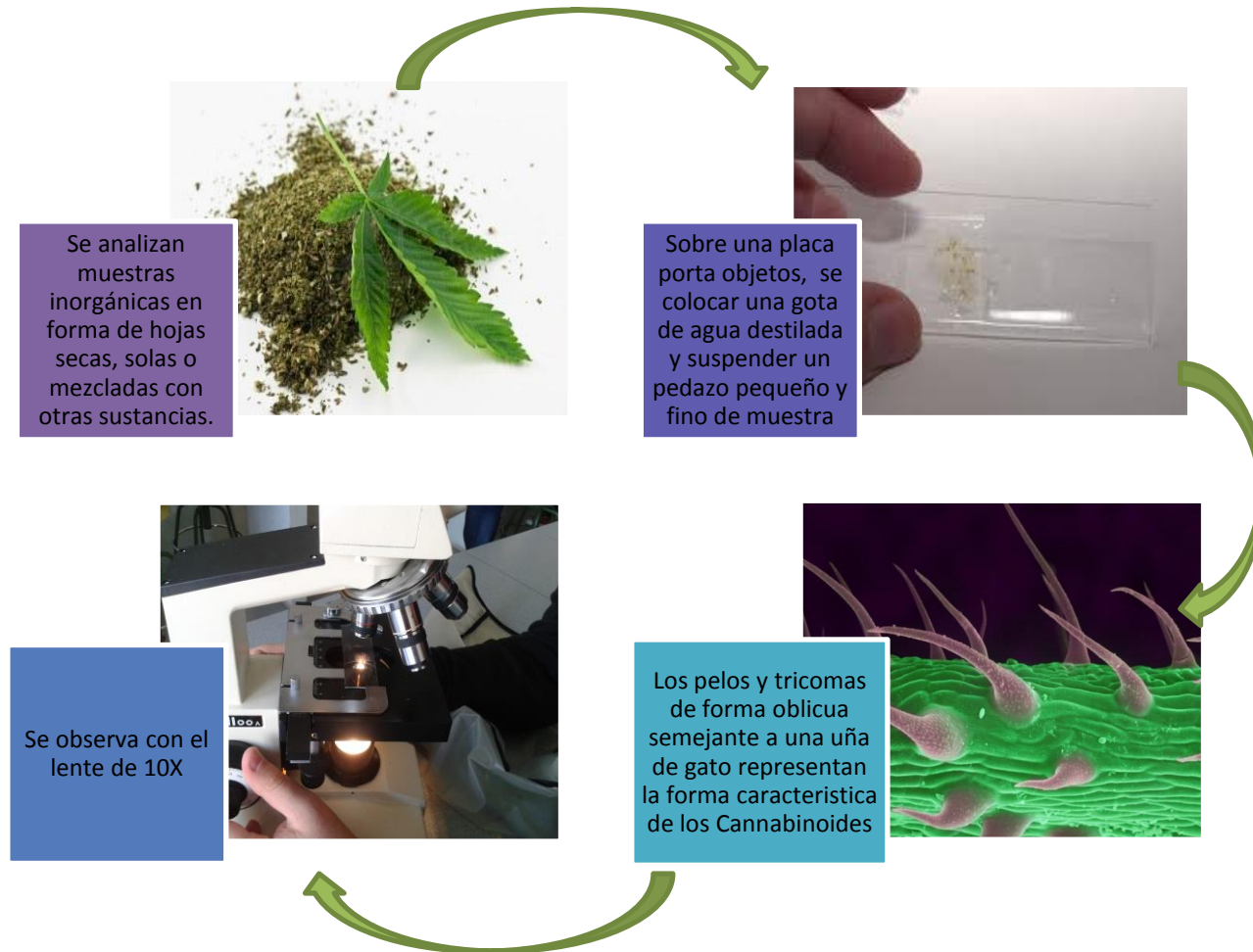
Nota: Todos los reactivos existentes dentro del Laboratorio de Química Forense de la Provincia de Chimborazo son de pureza analítica cuya información es reservada por la Institución. .

3.2. Métodos y técnicas de análisis

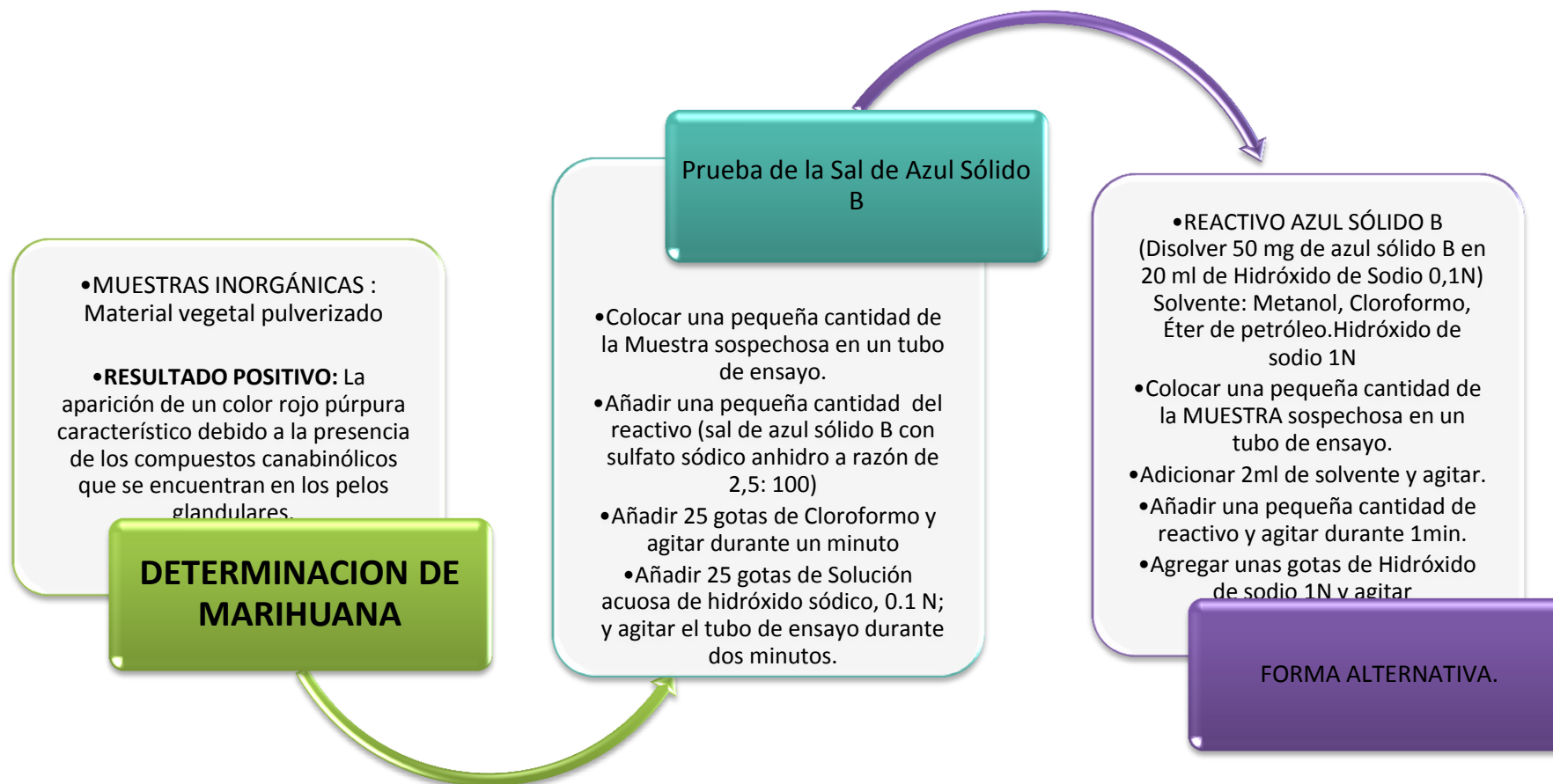
3.2.1. Pruebas presuntivas



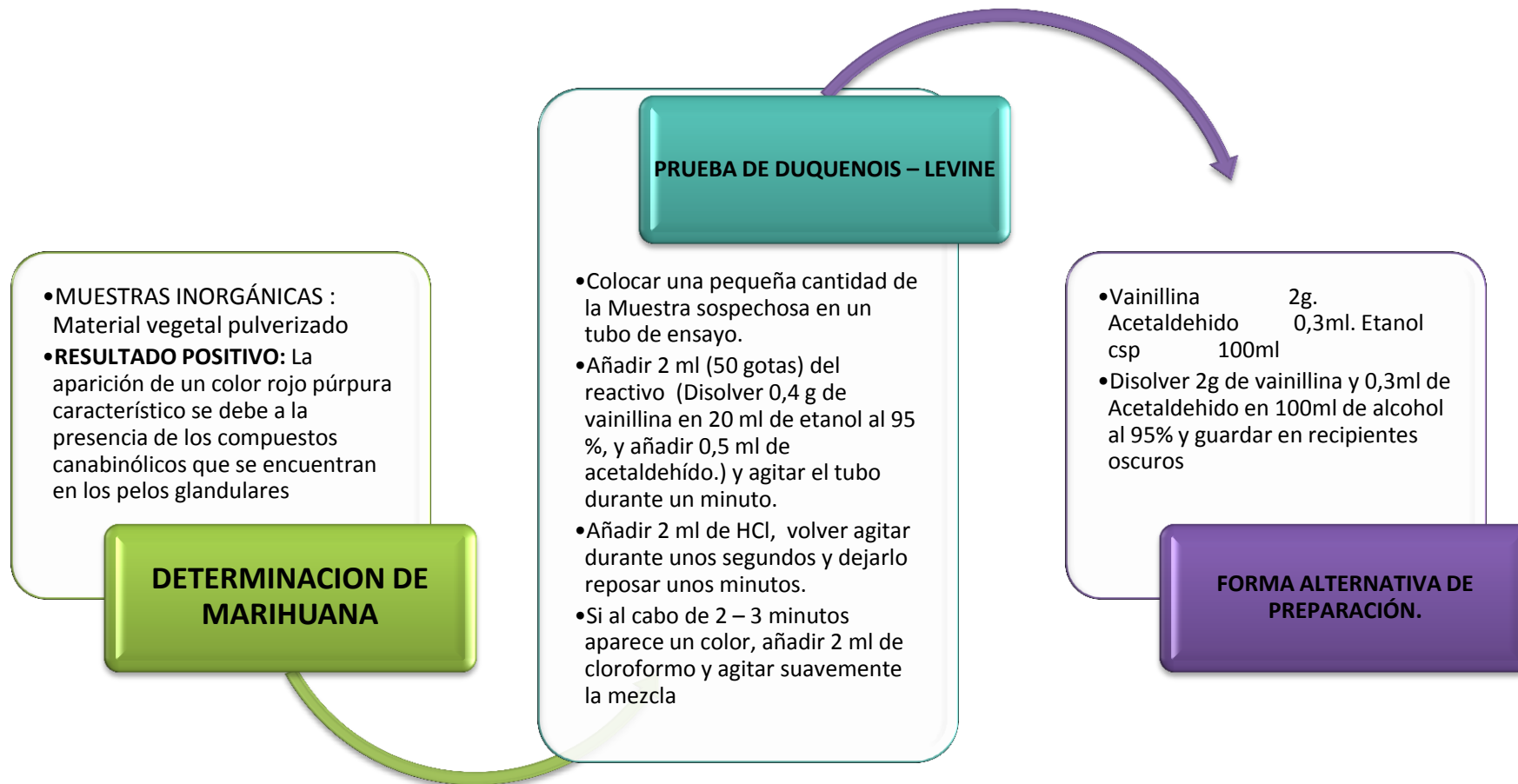
3.2.2. Identificación de marihuana mediante el microscopio



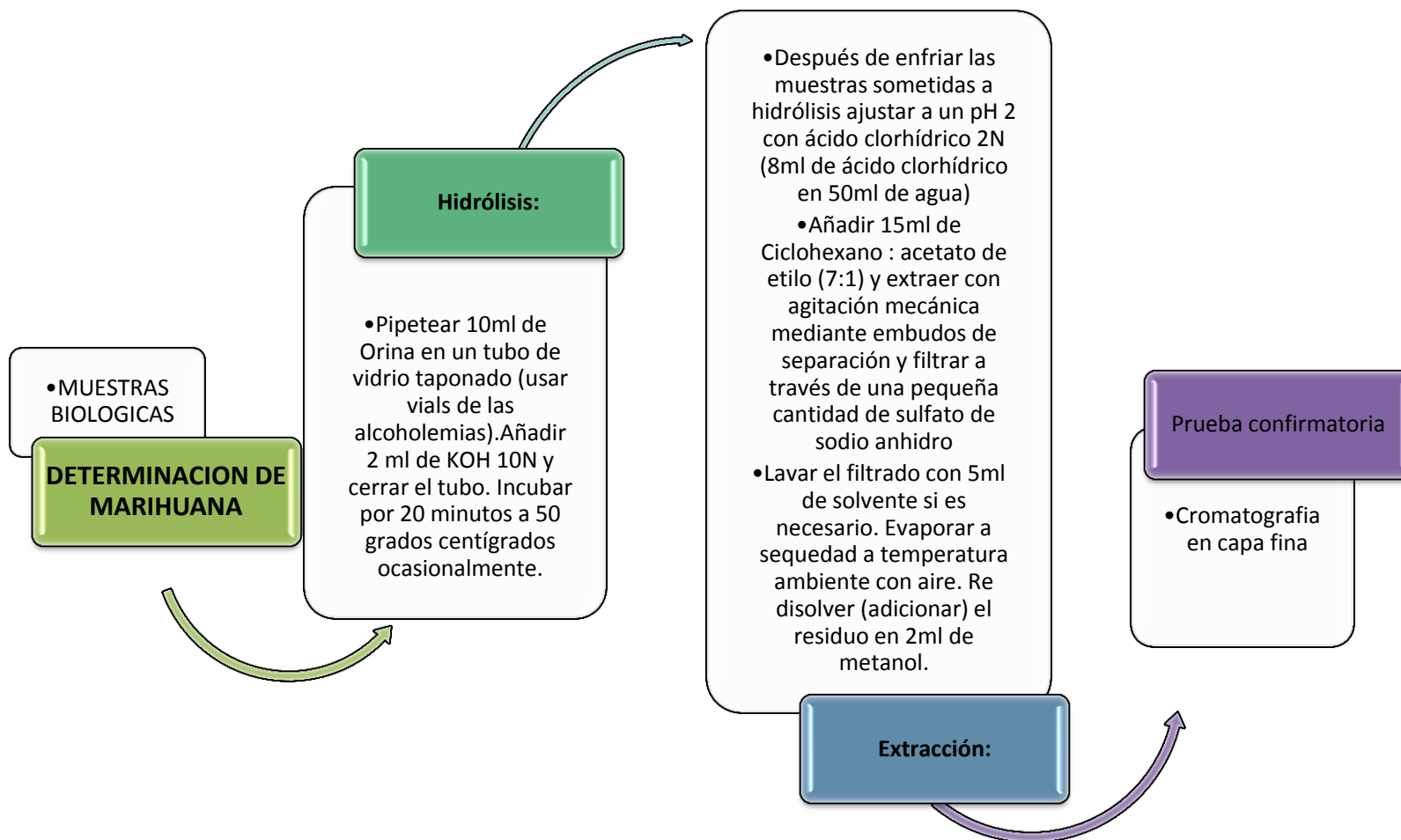
3.2.3. Identificación de marihuana mediante la Prueba Colorimétrica Sal de Azul Sólido B



3.2.4. Identificación de marihuana mediante la Prueba Colorimétrica DUQUENOIS – LEVINE



3.2.5. Extracción de marihuana mediante muestras biológicas.



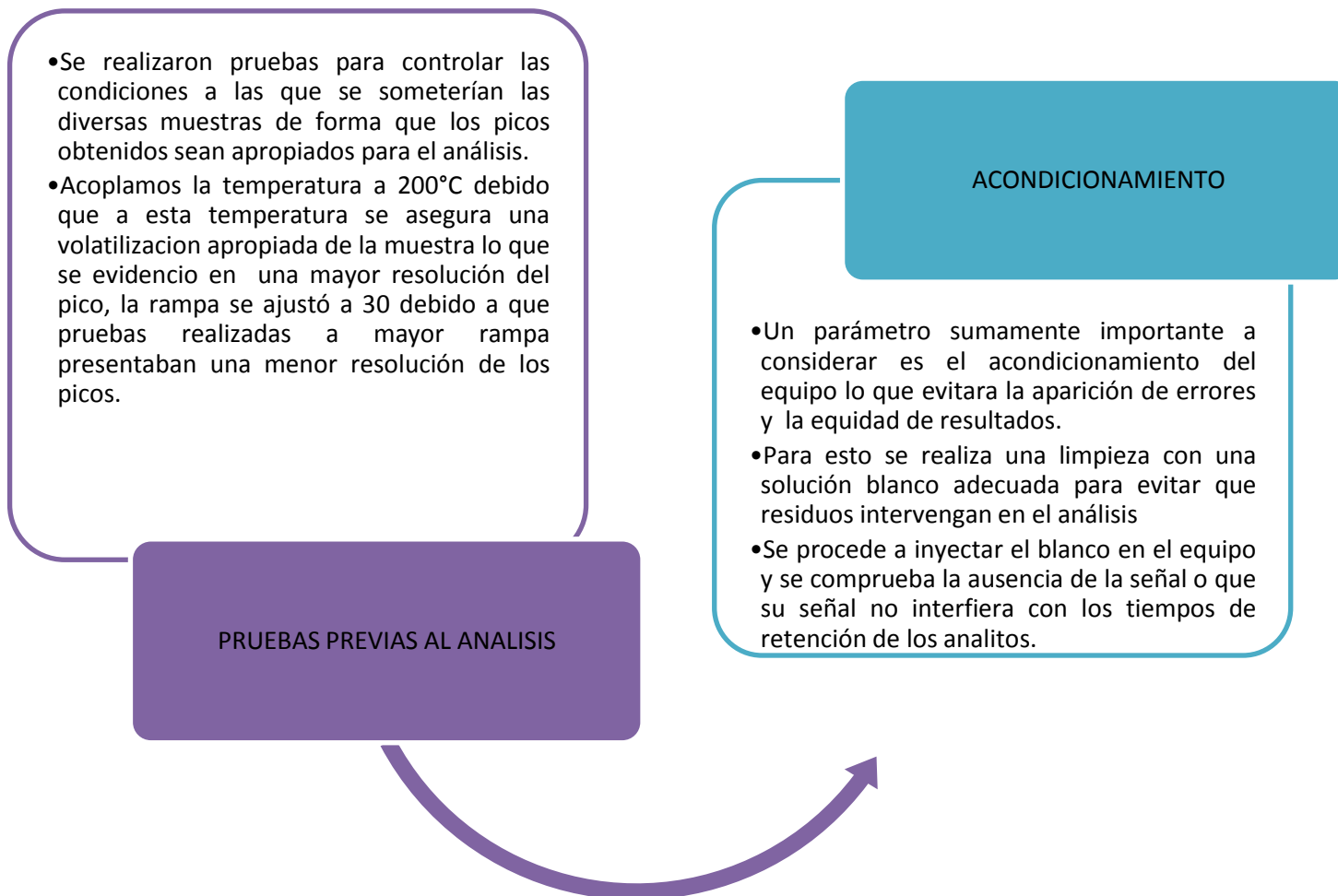
3.2.6. Pruebas Confirmatorias

3.2.6.1. Determinación de Cannabinoides por Cromatografía en Capa Fina

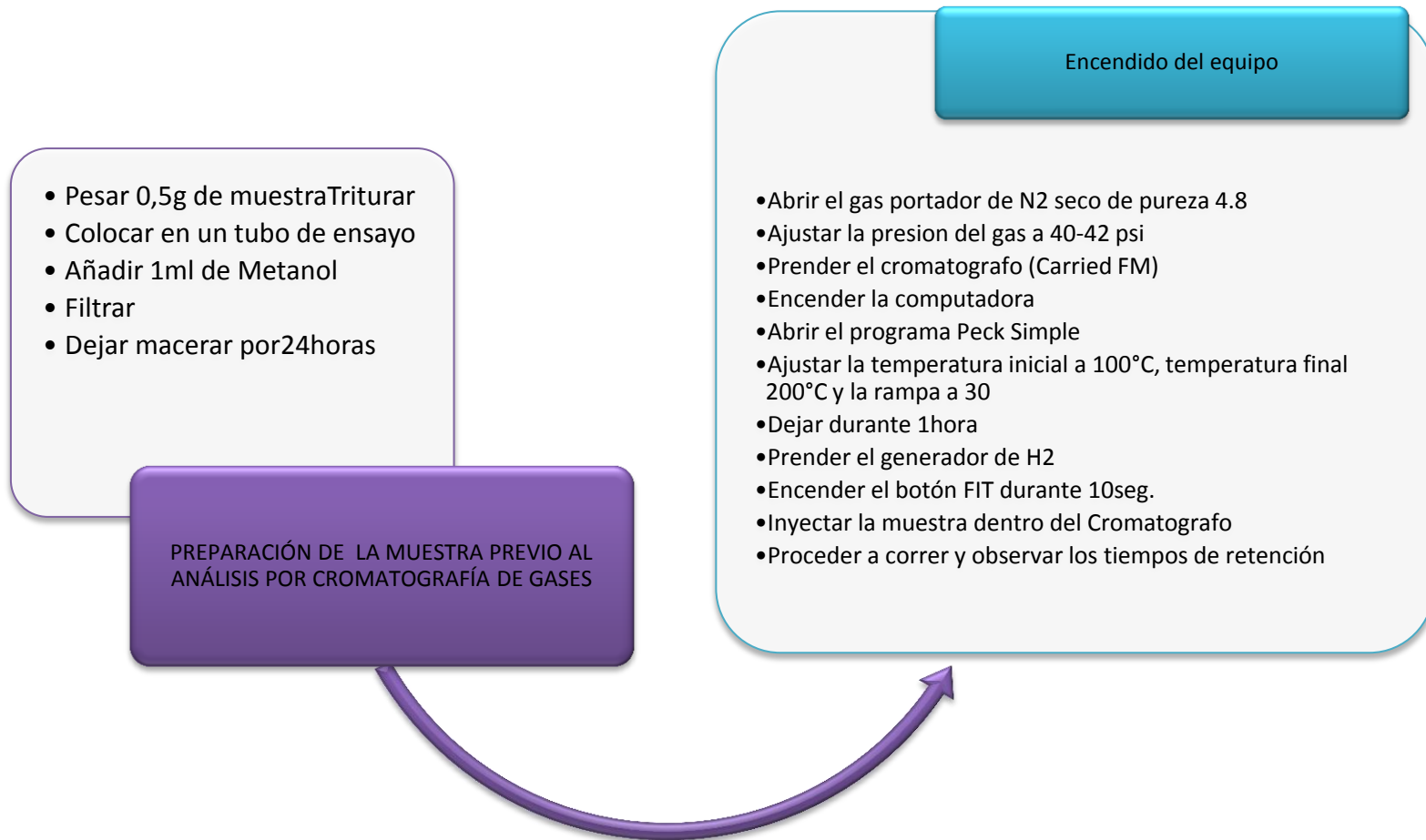
CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

- Triturar una pequeña cantidad de muestra en un mortero
- Colocar en un tubo de ensayo y añadir 10mL de Metanol
- Filtrar el contenido
- Colocar 10mL de Ciclohexano y proceder a separar las fases mediante un embudo de separación
- Se recoge la parte superior que es la parte orgánica de interés y se desecha la parte inorgánica
- Mediante un capilar se coloca una gota de la muestra Problema o de la muestra biológica previa extracción en la parte inferior de la sílica gel aproximadamente a 1,5cm y se repite el proceso de 3-4 veces dejándolo secar al ambiente
- Se coloca el sistema de solventes en la cuba cromatográfica Ciclohexano : Tolueno: Dietilamina en una proporción 75: 15:10
- En el interior de la cuba cromatográfica se introduce la placa de sílica gel que contiene la muestra.
- Se retira la placa una vez que llegue a la línea superior marcada.
- Se revela físicamente mediante luz UV a 254 y 366 nm

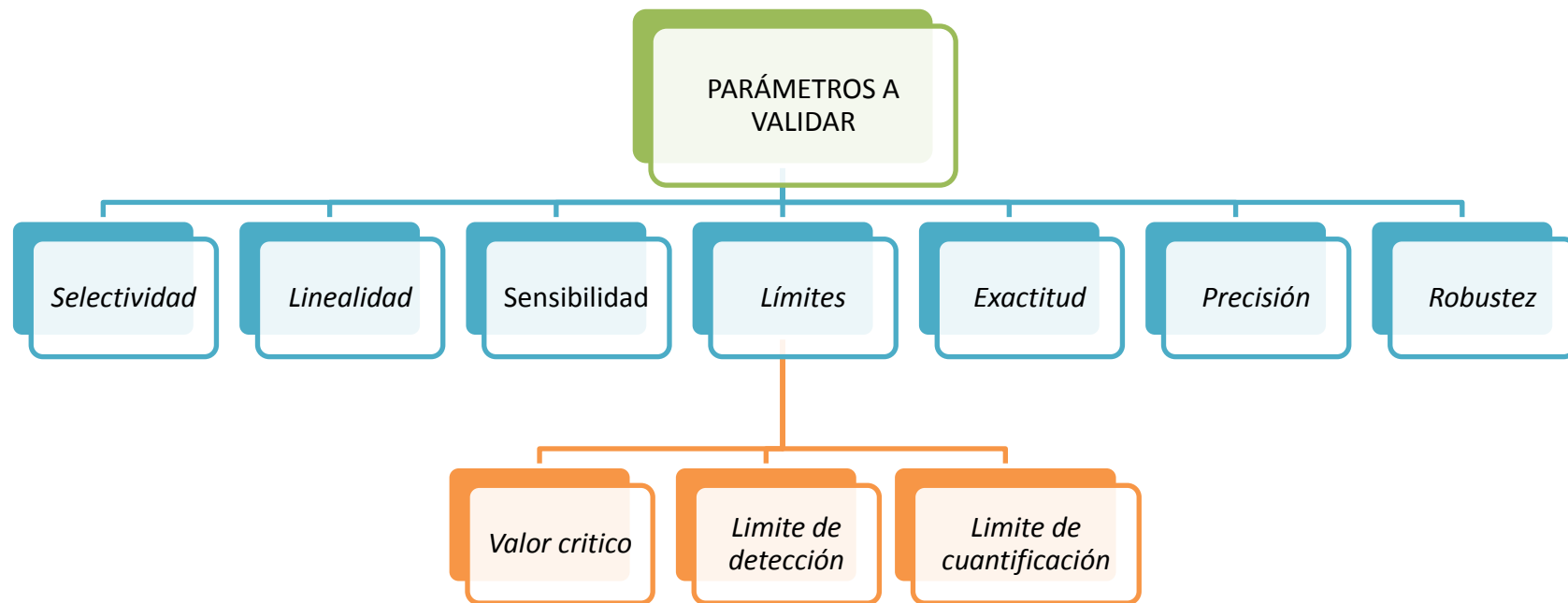
3.2.6.2. Pruebas previas al análisis



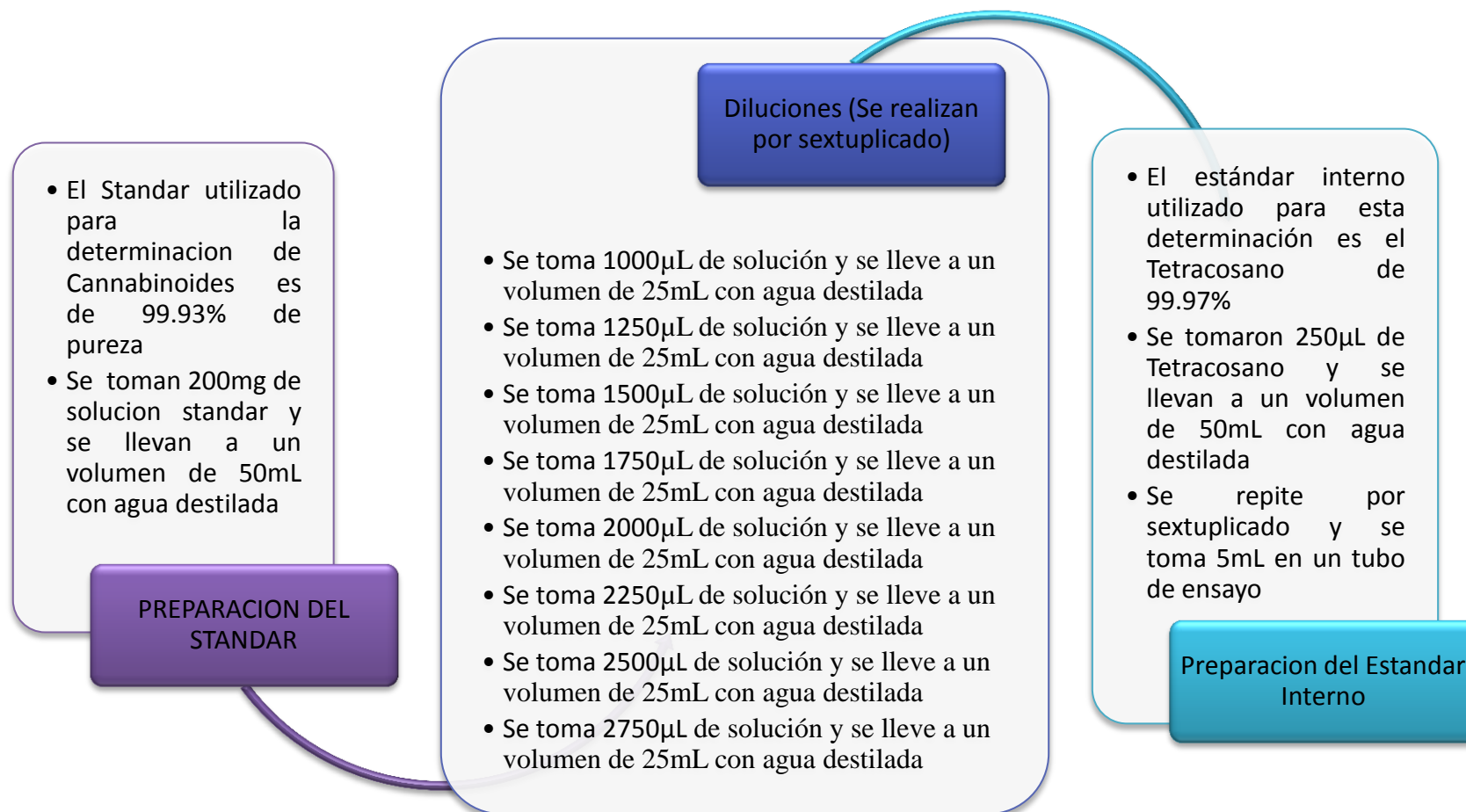
3.2.6.3. Determinación de marihuana mediante el Método de Cromatografía de Gases



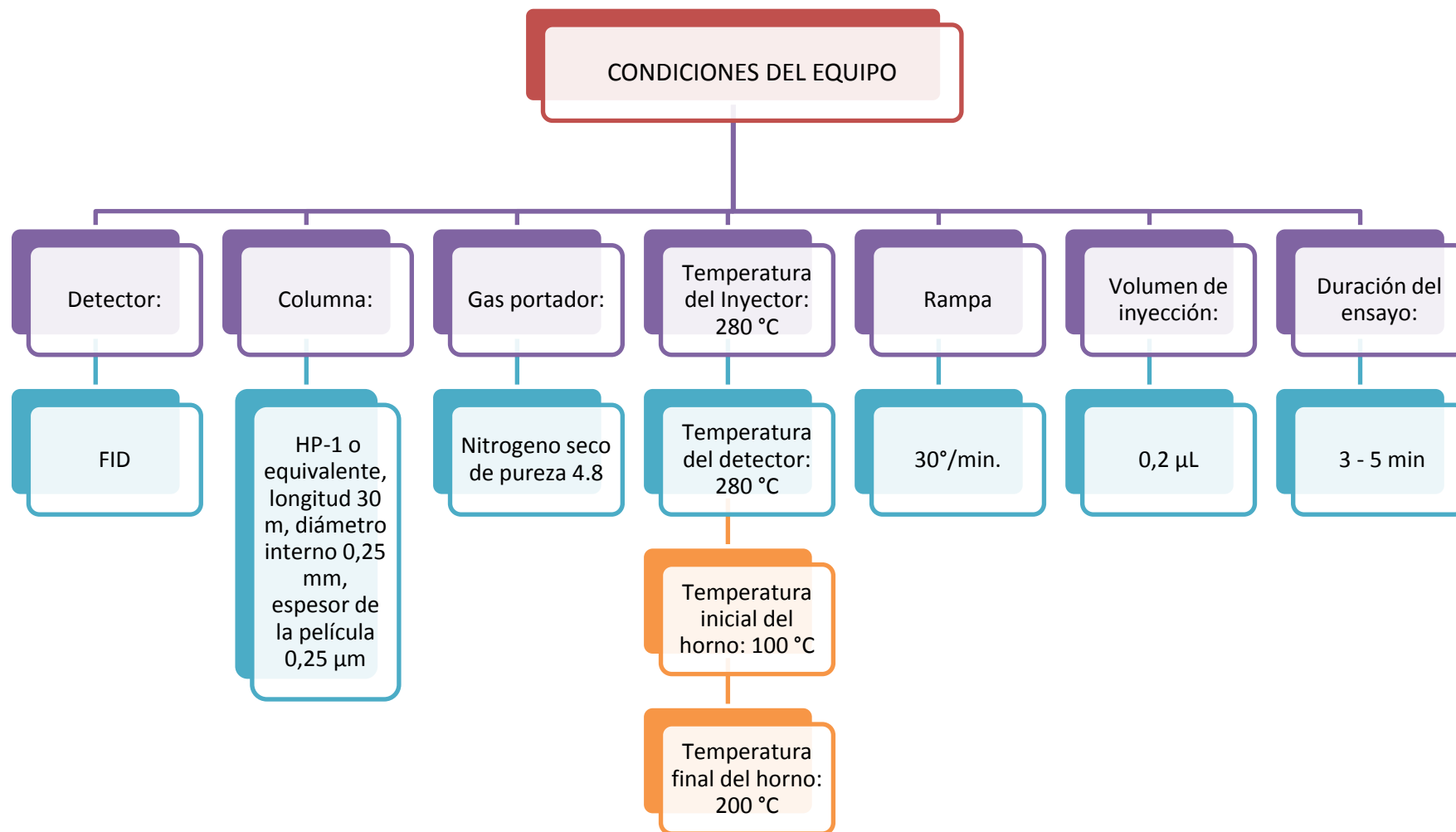
3.2.7. Validación



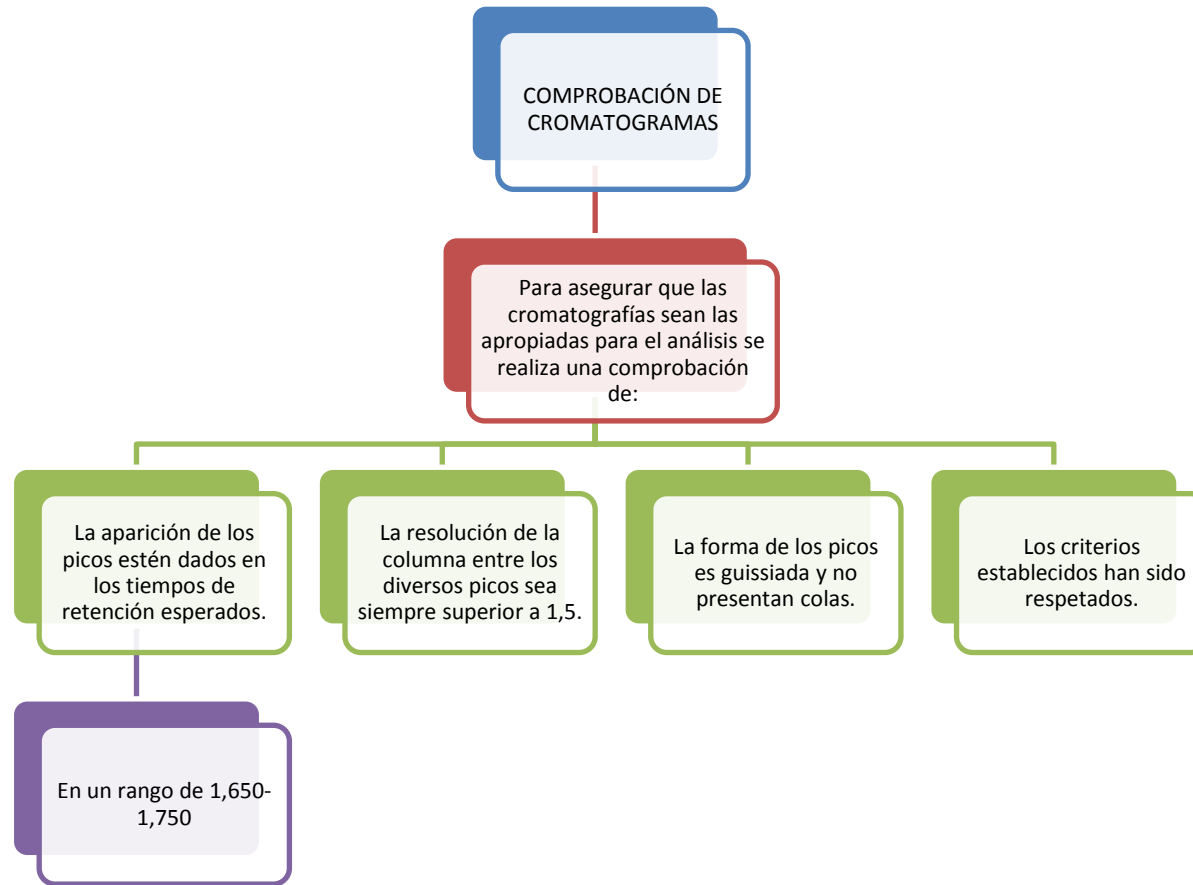
3.2.7.1. Preparación de Estándares previa calibración



3.2.7.2. Condiciones previas del equipo



3.2.7.3. Comprobación de cromatografías



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados

Tabla 1-4. Muestras analizadas durante el periodo de investigación

MESES DE ANALISIS	No. MUESTRAS
SEPTIEMBRE	16
OCTUBRE	19
NOVIEMBRE	23
DICIEMBRE	21
ENERO	18
TOTAL	97

Realizado por: Estefanía Heredia

Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

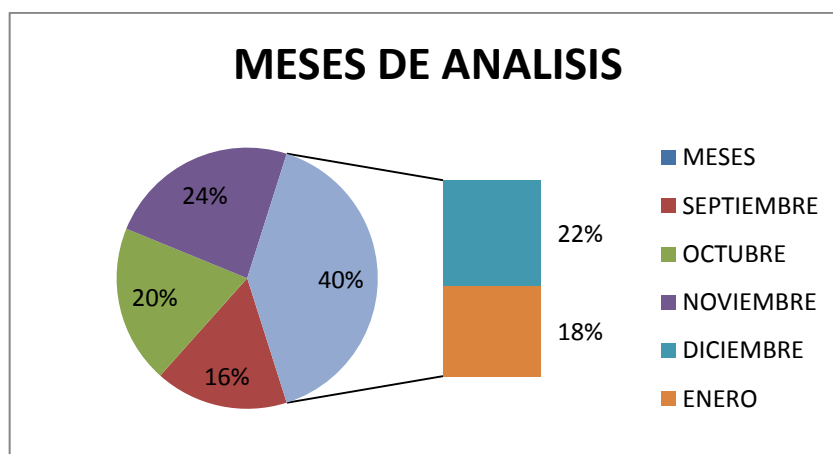


Gráfico 1-4. Muestras analizadas durante el periodo de investigación

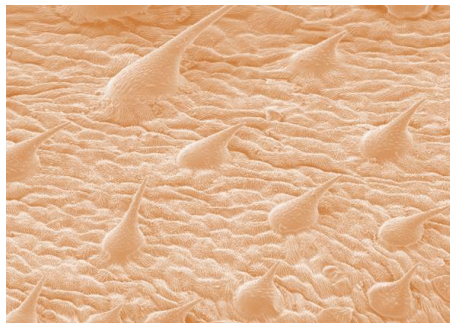
Realizado por: Estefanía Heredia

Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

El tiempo de análisis comprendió desde Septiembre hasta Enero y se manifiesta un mayor porcentaje en el mes de Noviembre y un menor porcentaje en Septiembre, sin embargo no se pudo evidenciar una marcada diferencia entre las muestras incautadas durante el periodo de investigación.

4.1.1. Pruebas presuntivas

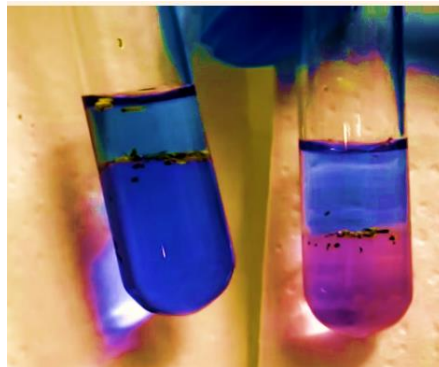
Figura 1-4. Cannabis vista a través del microscopio



Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

Se analizaron las muestras ingresadas durante el periodo de septiembre a enero observando mediante el microscopio la forma característica de uña de gato por lo que se presume que las muestras analizadas pertenecen a la *Cannabis*.

Figura 2-4 Prueba de Duquenois-Levine y Prueba de Sal Azul Solido respectivamente



Realizado por: Estefanía Heredia

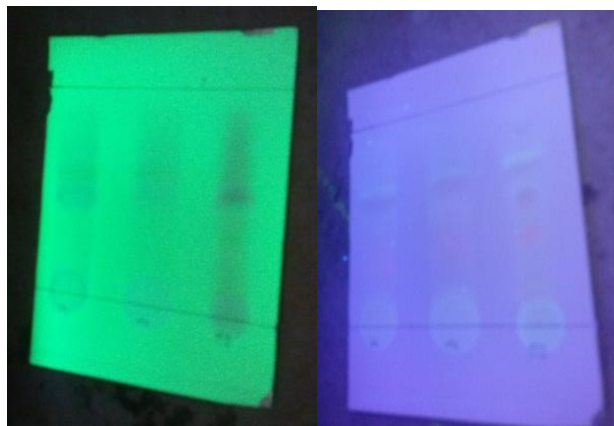
Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

Se realizaron las pruebas colorimétricas tanto de Duquenois - Levine como de Sal Azul Solido B las cuales evidenciaron un cambio de color característico por lo que se presume la presencia de Cannabinoides.

4.1.2. Pruebas confirmatorias

4.1.2.1. Cromatografía en capa fina

Figura 3-4 Cromatografía en capa fina observada por luz UV a 254 y 366nm respectivamente



Realizado por: Estefanía Heredia
Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el solvente}}$$

Para confirmar que las muestras analizadas tanto por el Microscopio como por las Pruebas Colorimétricas se realizó una prueba confirmatoria de Cromatografía en Capa Fina, esto confirmo que efectivamente las muestras son de *Cannabis* además esta prueba permitió observar los 3 Cannabinoides principales, el CBN que se mantiene en la línea base debido a que el solvente no lo arrastra, el THC es el segundo en aparecer con un $R_f = 0,60$ y en tercer lugar el CBD con un $R_f = 0,97$

4.2. Pruebas de hipótesis

4.2.1. Selectividad

Se obtuvieron los parámetros cromatográficos principales de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$K' = \frac{tr - tm}{tm}$$

$$\alpha = \frac{tr(M_1) - tm}{tr(M_2) - tm}$$

$$R_s = \frac{2tr_b - tr_a}{w_b + w_a}$$

En donde se definió el $tm = 0,300$, $L = 30m$

Tabla 2.4. Parámetros cromatográficos

ST		Tr	AREA	K'	w	N	RS	α
1	CBD	0,6468	0,2453	1,156	0,163	0,178	7,957	0,246
	THC	1,7080	0,1323	4,693	0,168	1,317		
2	CBD	0,6553	0,2623	1,184	0,163	0,183	8,349	0,236
	THC	1,7053	0,3087	4,684	0,167	1,298		
3	CBD	0,5720	0,3695	0,906	0,164	0,141	8,484	0,195
	THC	1,6943	0,5278	4,648	0,168	1,296		
4	CBD	0,6185	0,4777	1,062	0,162	0,161	8,376	0,230
	THC	1,6830	0,7460	4,610	0,166	1,249		
5	CBD	0,7131	0,6143	1,377	0,163	0,216	8,054	0,296
	THC	1,6935	0,9475	4,645	0,169	1,311		
6	CBD	0,6575	0,8078	1,192	0,164	0,186	8,339	0,254
	THC	1,7048	1,1579	4,683	0,166	1,281		
7	CBD	0,6957	0,9080	1,319	0,163	0,206	8,126	0,285
	THC	1,6887	1,4046	4,629	0,167	1,273		
8	CBD	0,7877	2,2398	1,626	0,162	0,261	7,948	0,347
	THC	1,7053	1,6372	4,684	0,168	1,313		

Realizado por: Estefanía Heredia

Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

De acuerdo a la Tabla 2-4 se identificó que para cada medición realizada la Resolución es mayor a 1,5 esto quiere decir que los diferentes analitos se encuentran separados y bien definidos comprobando así que el método es selectivo.

4.2.2. Linealidad

Para validar la linealidad del sistema se utiliza la curva de calibración de estándares indicada anteriormente en la Grafica 2-4. En ella se evidencia la ecuación de la recta:

$$y = bx + a$$

$$y = 446,33x - 6,2397$$

x: concentración del analito

y: respuesta

a: intercepto

b: valor de la pendiente

Tabla 3-4. Concentración de estándar y la relación de áreas del ST/STI

Concentración del ST	Relación de áreas(ST/STI)
0,0159	1,0965
0,0199	2,5586
0,0239	4,3746
0,0279	6,1832
0,0319	7,8533
0,0360	9,5972
0,0399	11,6419
0,0439	13,5698

Realizado por: Estefanía Heredia

Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

$$\sum x^2 = 7,8312 \times 10^{-3}$$

$$\sum x = 0,2393$$

$$\bar{x} = 0,0299$$

$$\sum y^2 = 538,5717$$

$$\sum y = 56,8751$$

$$\bar{y} = 7,1094$$

$$\sum xy = 2,0017$$

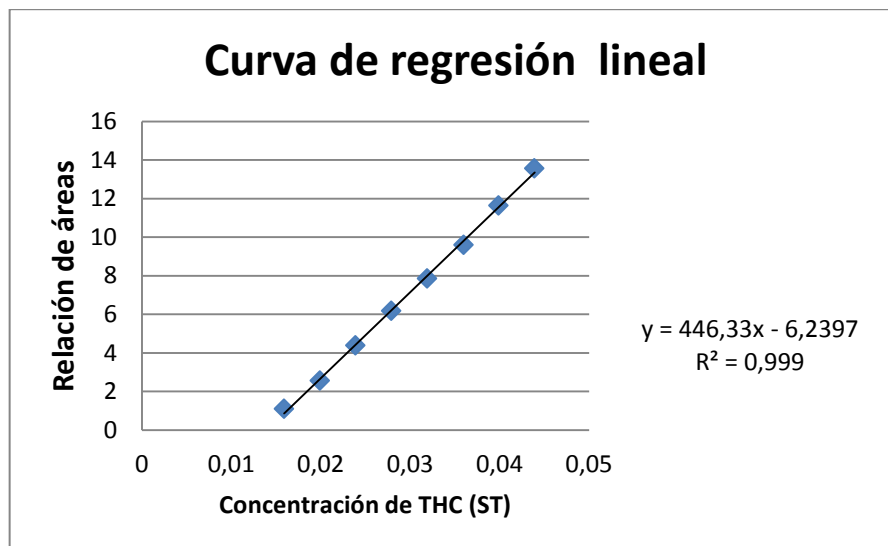


Grafico 2-4. Curva de calibración de la Relación de áreas con los diferentes Estándares Vs. La Concentración.

Realizado por: Estefanía Heredia

Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

La Curva de Calibración representa la relación de áreas del Estándares con respecto al Estándar Interno, esto se realiza debido a que se necesita tomar un patrón de referencia conocido para determinar las concentraciones en las que se encuentran cada uno de los estándares y las diferentes muestras que se analizaron durante el periodo de investigación.

Para determinar la linealidad del sistema se toma en cuenta el coeficiente de correlación: lineal.

$$S_{xy} = \frac{\sum x \cdot y}{n} - \bar{x} - \bar{y}$$

$$S_{xy} = 2,0017/8 - 0,0299 - 7,1094$$

$$S_{xy} = 7,3297$$

S_{xy}: desviacion estandar de xy

\bar{x} : media de de la sumatoria de x

\bar{y} : media de de la sumatoria de y

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n} - (\bar{x})^2}$$

$$S_x = \sqrt{\frac{7,8312 \times 10^{-3}}{8} - (0,0299)^2}$$

$$S_x = \sqrt{8,4151 \times 10^{-5}}$$

$$S_x = 9,1734^{-3}$$

S_x: desviacion estandar de x

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum y^2}{n} - (\bar{y})^2}$$

$$S_y = \sqrt{\frac{538,5717}{8} - (7,1094)^2}$$

$$S_y = \sqrt{16,7781}$$

$$S_y = 4,0961$$

S_y: desviacion estandar de y

$$r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$$

$$r = \frac{8(2,0017) - (0,2393)(56,8751)}{\sqrt{[8(7,8312 \times 10^{-3}) - (0,2393)^2][8(538,5717) - (56,8751)^2]}}$$

$$r = \frac{2,4031}{\sqrt{[5,3851 \times 10^{-3} \times 1073,7967]}}$$

$$r = 0,9993$$

r: coeficiente de correlación

Tabla 4-4. Estadística de la regresión lineal

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99929851
Coeficiente de determinación R²	0,99859752
R² ajustado	0,99836377
Error típico	0,17712893
Observaciones	8

Realizado por: Estefanía Heredia
Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

Tabla 5-4. Análisis de los residuales

Análisis de los residuales			
	\hat{y}	$Y_i - \hat{y}$	$(Y_i - \hat{y})^2$
Observación	<i>Pronóstico Relación de áreas</i>	<i>Residuos</i>	<i>Residuos estándares</i>
1	0,856892176	0,239607824	1,461116658
2	2,642203592	-0,083603592	-0,509810568
3	4,427515008	-0,052915008	-0,322673099
4	6,212826423	-0,029626423	-0,180660464
5	7,998137839	-0,144837839	-0,883213979
6	9,814692205	-0,217492205	-1,326256706
7	11,56876067	0,073139329	0,446000012
8	13,35407209	0,215727914	1,315498146
Promedio	56,8751	$-6,88338 \times 10^{-15}$	$-4,19664 \times 10^{-14}$

Realizado por: Estefanía Heredia
Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

Para verificar los resultados se realizó un t-Student con n-2 grados de libertad a dos colas y $\alpha=0.05$

Ho: no existe correlación entre x(concentración del ST) e y (relación de áreas)

H1: existe correlación entre x(concentración del ST) e y (relación de áreas)

$$t_{\text{calculado}} = \frac{r\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{1-r^2}}$$

$$t_{\text{calculado}} = \frac{0,9993\sqrt{(8-2)}}{\sqrt{1-0,9986}}$$

$$t_{\text{calculado}} = \frac{2,4478}{0,0374}$$

$t_{\text{calculado}}$: valor practico calculado

r: correlación lineal

n: número de muestras analizadas

$$t_{\text{calculado}} = 65,4492$$

$$t_{\text{critico}} = 2,447$$

$t_{\text{calculado}} \geq t_{\text{critico}}$ de forma que se rechaza la Ho
y se acepta la H1

El valor de r y r^2 es $\geq 0,999$ evidenciando que existe una linealidad entre los resultados obtenidos, además mediante el t-Student se rechazó la hipótesis nula (Ho), confirmando que existe una correlación lineal entre los datos.

4.2.3. *Sensibilidad*

Para calcular la sensibilidad dentro de regresión lineal se la identifica como la pendiente calculada (m) por la siguiente ecuación:

$$m = \frac{\sum xy - (\sum x \sum y / n)}{\sum x^2 - \left(\frac{(\sum x)^2}{n}\right)}$$

$$m = \frac{2,0017 - (0,2393 \times 56,8751/8)}{7,8312 \times 10^{-3} - ((0,2393)^2 / 8)}$$

$$m = \frac{0,3004}{6,7321 \times 10^{-4}}$$

$$m = 446,33$$

El valor de la pendiente nos permite hacer una discriminación de los valores, de modo que se define al método como sensible. En este caso se observa que mientras más próxima al eje de las Y esté la recta, significa que a ligeros cambios en las concentraciones esperadas habrá grandes variaciones en los resultados.

4.2.4. Límites

$$y = 446,33x - 6,2397$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y)^2}{n - 2}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{4,19664 \times 10^{-14}}{6}}$$

$$S_{y/x} = 0,000000084$$

$S_{y/x}$: desviación estándar de la regresión lineal

$$y_B = S_b x^3 + a$$

$$y_B = 0,000000084 x^3 - 6,2397$$

$$y_B = -6,239699749$$

y_B : es el valor de y en el origen de la regresión lineal

S_b : desviación estándar

a: intercepto

$$LOD = Sb^3/b$$

$$LOD = 0,000000084x3/446,33$$

$$LOD = 5,62135x10^{-10}$$

LOD: límite de detección

$$yQ = Sb \cdot 10 + a$$

$$yQ = 0,000000084 \cdot 10 - 6,2397$$

$$yQ = -6,239699164$$

yQ: es el valor de y en el origen de la regresión lineal

$$LQ = Sb \cdot 10 / b$$

$$LQ = 0,000000084 \cdot 10 / 446,33$$

$$LQ = 1,87378x10^{-9}$$

LQ: límite de cuantificación

Tabla 6-4. *Análisis de los residuales*

SB=Sy/x	0,000000084
a	-6,2397
b	446,33
yB	-6,239699749
LOD	$5,62135x10^{-10}$
yQ	-6,239699164
LQ	$1,87378x10^{-9}$

Realizado por: Estefanía Heredia
Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

EL límite de detección esta expresado por $LOD= 5,62135 \times 10^{-10}$ demostrando que el equipo es óptimo para determinar cantidades mayores o iguales al límite de detección encontrado.

El límite de cuantificación esta expresado por $LQ= -1,87378 \times 10^{-9}$ determinando así que el equipo es óptimo para cuantificar concentraciones mayores o iguales al límite encontrado.

4.2.5. *Exactitud*

$$\%Rendimiento = \frac{Conc. \text{práctica}}{Conc. \text{teórica}} \times 100$$

$$\%Rendimiento = \frac{0,02990856}{0,02990875} \times 100$$

$$\%Rendimiento = 99,9994$$

$$\%Error = \frac{(Conc. \text{práctica} - Conc. \text{teórica})}{Conc. \text{teórica}} \times 100$$

$$\%Error = \frac{(0,02990856 - 0,02990875)}{0,02990875} \times 100$$

$$\%Error = 0,0006\%$$

Mediante el análisis de rendimiento y del error podemos demostrar que existe un alto grado de rendimiento por parte del método y que presenta mínimas variaciones de error dentro del estudio por lo que se considera al método como exacto.

4.2.6. *Precisión*

Para determinar la precisión se calcula partiendo del análisis de los estándares de acuerdo a los tiempos de retención y se analiza la desviación estándar (S) y el porcentaje de variación (%CV)

El criterio de aceptabilidad para la precisión se puede hacer en base a coeficiente de variación de Horwitz:

$$S = \frac{\sqrt{\sum(y_i - \bar{y})^2}}{n - 1}$$

$$S = \frac{\sqrt{4,19664 \times 10^{-14}}}{7}$$

$$S = 2,92653 \times 10^{-8}$$

$$\%CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

$$\%CV = \frac{2,92653 \times 10^{-8}}{0,0299} \times 100$$

$$\%CV = 9,784 \times 10^{-5} \%$$

$$\%CVh = 0,02 \times c^{0.8495} \qquad = \%CVh = 2^{(1-0.5)\log C}$$

$$C = 1 \times 10^{-6}$$

C: valor nominal del analito en potencia de diez

$$\%CVh = 0,125\%$$

La fórmula para calcular el coeficiente de varianza para una prueba interlaboratorio es:

$$\%CVh = 2 * \%CVh / 3$$

$$\%CVh = 2 * 0,125\% / 3 = 8,333 \times 10^{-2}$$

S: desviación estándar

\bar{y} : media de de la sumatoria de y

C: concentración en potencia de 10, en este caso ppm

%CV: coeficiente de variación

%CVh: coeficiente de varianza de Horwitz

Se aplica la fórmula $\%CV < \%2CVh/3$ por tratarse de una reproducibilidad interlaboratorio y se observa que se cumple el criterio de aceptabilidad establecido, además según la normativa de la UNODC se establece que el $\%CV$ debe ser $\leq 2\%$ por lo que se considera al método preciso. Además se aplicó el Test de Fisher para análisis de varianzas como muestra la Tabla 7-4.

Tabla 7-4. Analisis de varianzas test de Fisher

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	134,036337	134,036337	4272,1211 1	8,6253x10 ⁻¹⁰
Residuos	6	0,18824795	0,03137466		
Total	7	134,224585			

Realizado por: Estefanía Heredia

Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

Ho: no existe varianza entre x(concentración del ST) e y (relación de áreas)

H1: existe varianza entre x(concentración del ST) e y (relación de áreas)

F es \geq F crítico por lo que se rechaza la H1
y se acepta la Ho

Mediante el test de Fisher se comprueba que no existe varianzas significativas en los datos analizados por lo que se comprueba al método como preciso

4.2.7. Robustez

Para determinar la robustez de un sistema se aplica la Prueba de Youden y Steiner como se muestra en la siguiente tabla. (Quattrocchi O, col. 1992 pp 29-40)

Tabla 8-4. Análisis de los residuales

N °	Clave	Descripción	Valor normal	Valor de la letra mayúscula	Valor de la letra minúscula
1	A/a	Temperatura del inyector	280°C	285°C	275°C
2	B/b	Temperatura del detector	280°C	285°C	275°C
3	C/c	Temperatura inicial del horno	100°C	200°C	80°C
4	D/d	Temperatura final del horno	200°C	240°C	180°C
5	E/e	Volumen de inyección	0,2 µl	0,5 µl	0,1 µl

Realizado por: Estefanía Heredia
Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

Tabla 9-4. Prueba de Youden y Steiner

Clave	Análisis							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Realizado por: Estefanía Heredia
Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

Tabla 10-4. Analisis con respecto a la Prueba de Youden y Steiner

Clave	Análisis							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	285	285	285	285	275	275	275	275
B/b	285	285	275	275	285	285	275	275
C/c	200	80	200	80	200	80	200	80
D/d	240	240	180	180	180	180	240	240
E/e	0,5	0,1	0,5	0,1	0,1	0,5	0,1	0,5
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z
	202,1	178,02	188,1	164,02	188,02	164,1	198,02	174,1

Realizado por: Estefanía Heredia
Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

Para calcular los promedios se utilizan las siguientes ecuaciones como nos indica la Prueba de Youden y Steine:

$$A = \frac{(s + t + u + v)}{4}$$

$$A = \frac{(202,1 + 178,02 + 188,1 + 164,02)}{4}$$

$$A = 183,06$$

$$a = \frac{(w + x + y + z)}{4}$$

$$a = \frac{(188,02 + 164,1 + 198,02 + 174,1)}{4}$$

$$a = 181,06$$

$$B = \frac{(s + t + w + x)}{4}$$

$$B = \frac{(202,1 + 178,02 + 188,02 + 164,1)}{4}$$

$$B = 183,06$$

$$b = \frac{(u + v + y + z)}{4}$$

$$b = \frac{(188,1 + 164,02 + 198,02 + 174,1)}{4}$$

$$b = 181,06$$

$$C = \frac{(s + u + w + y)}{4}$$

$$C = \frac{(202,1 + 188,02 + 188,02 + 198,02)}{4}$$

$$C = 194,06$$

$$c = \frac{(t + v + x + z)}{4}$$

$$c = \frac{(178,02 + 164,02 + 164,1 + 174,1)}{4}$$

$$c = 170,06$$

$$D = \frac{(s + t + y + z)}{4}$$

$$D = \frac{(202,1 + 178,02 + 198,02 + 174,1)}{4}$$

$$D = 188,06$$

$$d = \frac{(u + v + w + x)}{4}$$

$$d = \frac{(188,1 + 164,02 + 188,02 + 164,1)}{4}$$

$$d = 176,06$$

$$E = \frac{(s + u + x + z)}{4}$$

$$E = \frac{(202,1 + 188,1 + 164,1 + 174,1)}{4}$$

$$E = 182,1$$

$$e = \frac{(t + v + w + y)}{4}$$

$$e = \frac{(178,02 + 164,02 + 188,02 + 198,02)}{4}$$

$$e = 182,02$$

$$S = 2,92653 \times 10^{-8}$$

$$\sqrt{2}S = 2,419 \times 10^{-4}$$

Tabla 11-4. Prueba de Youden y Steiner

Condición		Promedio		Diferencia	Comparación
(X)	(x)	X	x	$\Delta(X-x)$	$\Delta \leq \sqrt{2}S$
A	a	183,06	181,06	2	Sensible a variable
B	b	183,06	181,06	2	Sensible a variable
C	c	194,06	170,06	24	Sensible a variable
D	d	188,06	176,06	12	Sensible a variable
E	e	182,1	182,02	0,08	Sensible a variable

Realizado por: Estefanía Heredia

Fuente: Departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo

En nuestra investigación se determinó que no se debe modificar las variables que se establecieron como sensibles durante el estudio de robustez puesto que cualquier variación puede determinar errores en los resultados de análisis.

4.2.8. Aplicabilidad

- El Método de Cromatografía de Gases tiene un amplio espectro de análisis para la identificación de Cannabinoides como son THC, CBDy CBN, además se puede determinar los analitos contenidos tanto en muestras incautadas como biológicas (orina, sangre, etc.) pero con previo tratamiento para evitar interferencias o falsos resultados.

- El método se puede utilizar no solamente para la determinación de Cannabinoides sino para un sinnúmero de drogas y compuestos y está en dependencia del tipo de columna con la que se trabaje.

4.3. Presentación de resultados

Tabla 12-4. Presentación de resultados de la validación

PARÁMETROS	RANGO	RESULTADO
Selectividad	$RS \geq 1,5$	Aceptable
Linealidad	$R \geq 0,999$	Aceptable
Sensibilidad	Pendiente cercana al eje y	Aceptable
Exactitud	$\%Error \leq 5\%$	Aceptable
Precisión	$\%CV \leq 2\%$ $\%CV < (2CVh\%/3)$	Aceptable
Robustez	$\Delta \leq \sqrt{2}S$	Aceptable
Aplicabilidad	-	Aceptable

Realizado por: Estefanía Heredia

La Tabla 12-4 es una representación simplificada de lo expuesto anteriormente y en ella se manifiesta que todos los parámetros evaluados cumplen con los requerimientos establecidos, asegurando así que el método de Cromatografía de Gases es apropiado para la determinación de Cannabinoides y que además detecta mínimas cantidades del analito con un porcentaje de error inapreciable que asegura la confiabilidad y veracidad de los resultados.

5. CONCLUSIONES

- Se pudo determinar cuantitativamente los grupos delta-9-tetrahydrocannabinol presentes en muestras incautadas mediante la curva de calibración utilizando 8 estándares de concentración conocida por análisis sextuplicado.
- Se establecieron experimentalmente los valores de cada parámetro con respecto a la UNODC como se muestra en la Tabla 1-1. y se comprobó que en cada análisis se cumple el rango de aceptación.
- Se pudo comprobar que el método de Cromatografía de Gases en condiciones ideales de trabajo provee resultados verdaderos y confiables de acuerdo a los parámetros pre-establecidos de la UNODC.
- La selectividad se analizó mediante el cálculo la resolución (RS) obteniendo valores mayores a 1,5 como muestra la Tabla 2-4., esto quiere decir que los diferentes analitos se encuentran separados y bien definidos.
- La linealidad se determinó mediante el coeficiente de variación r y r^2 es $\geq 0,999$, además para verificar los resultados se realizó un t-Student con $n-2$ grados de libertad a dos colas y $\alpha=0.05$ aceptando la H_1 que confirma que existe correlación lineal entre x (concentración de ST) e y (relación de áreas)
- La sensibilidad se calculó mediante la pendiente calculada (m) la cual demuestra que a mínimas variaciones de concentración existe grandes variaciones en los resultados, definiendo al método como sensible.
- El límite de detección calculado demuestra que el equipo es óptimo para determinar cantidades mayores o iguales a $5,62135 \times 10^{-10}$
- El límite de cuantificación calculado demuestra que el equipo es óptimo para cuantificar concentraciones mayores o iguales a $LQ = -1,87378 \times 10^{-9}$
- La exactitud se definió mediante dos parámetros: el rendimiento el cual fue 99,9994% y el error de 0,0006% demostrando que el método provee resultados exactos y confiables.
- La precisión se obtuvo mediante $\%CV < \%2CVh/3$ por tratarse de una reproducibilidad interlaboratorio y se observa que se cumple el criterio de aceptabilidad establecido, además se aplicó el test de Fisher con 1 grado de libertad

para el numerador y 6 grados de libertad para el denominador y $\alpha=0.05$, se acepta la H_0 demostrando que no existe varianzas significativas en los datos.

- Para determinar la robustez de un sistema se aplicó la Prueba de Youden y Steiner, en nuestra investigación se determinó que no se debe modificar las variables que se establecieron como sensibles durante el estudio de robustez puesto que cualquier variación puede determinar errores en los resultados de análisis.

6. RECOMENDACIONES

- Se debe considerar previo a cualquier análisis dentro del departamento de criminalística que la muestra receptada este acompañada de la cadena de custodia, además comprobar que las muestras no se hayan deteriorado mediante el almacenamiento y transporte previas al análisis.
- Al trabajar con silica gel se debe controlar la humedad del ambiente debido a que tiene cualidades higroscópicas que pueden influir en el momento del análisis.
- Al manipular el Cromatógrafo lo primero que se debe tomar en cuenta es que el gas portador este abierto a 40psi. y que la temperatura inicial del horno sea de 180°C, seguido de su acondicionamiento durante al menos 1hora.
- Se debe tener en cuenta los parámetros analizados en la robustez debido a que producen cambios significativos en los resultados, es por esto que antes de efectuarse cualquier análisis se debe acondicionar al equipo adecuadamente y evitar errores en los resultados finales
- Todos los análisis efectuados se deben realizar por triplicado para asegurar la confiabilidad de los resultados y disminuir errores.

7. BIBLIOGRAFÍA

BARQUERO QUIRÓS Miriam, Principios Y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases, 2ª. ed., Costa Rica, Editorial Universidad de Costa Rica, 2006, Pp 33-40

BELLO GUITIERREZ, JOSÉ Y LÓPEZ DE CERAIN SALSAMENDI, ADELA., Fundamentos de ciencia toxicológica, 1.ed., Madrid-España, Ediciones Díaz de Santos S. A, 2001, Pp 349

BLGO. CHAVIERI SALAZAR Andrés Ricardo, Principios fundamentales teóricos y prácticos de la fotografía forense y la escena del delito, 2a. ed., Lima-Peru, 2006, Pp 20-25

BRENNEISEN R, EGLI A, ELSOHLY MA, HENN V, SPIESS Y, The effect of orally and rectally administered delta-9-tetrahydrocannabinol on spasticity: a pilot study with 2 patients. Int J of Clin Pharmacol Ther, 22a. ed., -New York-USA, National Library of Medicine, 1996, Pp 34:446-452.

COULSON, J.M. Y J.F. RICHARDSON. Ingeniería Química. TomoII. Operaciones básicas. 2a. ed., Barcelona-España, Barcelona Editorial Reverté, 1988. Pp 32

FERNANDEZ-RUIZ JJ, RODRÍGUEZ F, NAVARRO M, RAMOS JA. Maternal cannabinoid exposure and brain development: changes in the ontogeny of dopamine neurons: Bartke A, Murphy LL (eds). Marihuana/cannabinoids: neurobiology and neurophysiology. Biochemistry and physiology of substance abuse, Florida-USA, CRC Press, 1992, Pp 119-64.

INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE, Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición, 1ed. Santiago de Chile- Chile, 2010, Pp 27-49

J.A. RAMOS ATANCE, Cannabinoides: propiedades químicas y aspectos metabólicos. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. Universidad Complutense, 2ª. ed., Madrid-España, Pp 41-54

LAUWERYS, ROBERT R. Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales/Robert R. Lauwerys, 3a ed. Barcelona-España, Masson S.A., 1994, Pp 631

LINDGREN JE, OHLSSON A, AGURELL S, HOLLISTER L, GILLESPIE H., Clinical effects and plasma levels of delta 9-tetrahydrocannabinol (delta 9-THC) in heavy and light users of cannabis. *Psychopharmacology* . 2 ed, New-York-USA, 1981, Pp 74

LODZKI M, GODIN B, RAKOU L, MECHOULAM R, GALLILY R, TOUITOU E., Cannabidiol transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *J Control Release*,. 3a. ed., New York-USA, 2003. Pp 93

MCNAIR, HAROLD M. & MILLER, JAMES M, Basic Gas Chromatography. John Wiley & Sons, Inc .3a. ed, Ottawa-Canada, 1998. Pp 73

NMKL, Validación de Métodos de análisis químicos Procedimiento, 4a. ed., 1996. Versión Español 1997 Pp 56-72

PERTWEE RG. Cannabinoid receptors and pain. *Progress in Neurobiology*. 12. Ed., USA, Elsevier Science Ltd,. 2001; 63: 569-611

QUATTROCCHI O, ABELAIRA S, LABA R, Validación de métodos. Introducción a la HPLC Aplicación y práctica, 2ª. ed., Buenos Aires- Argentina, Edit. Artes Gráficas Farro S.A., 1992, Pp. 29.-301

RAMOS ATANCE JA, FERNÁNDEZ RUIZ J., Cannabinoides: propiedades químicas y aspectos metabólicos. Adicciones,. 2a. ed, Madrid-España, 2000, Pp 41-56.

REMCO. ISO Committee on Reference Materials. 2005-08-24. Pp 15-38

SKOOG, Douglas Y LEARY, James, Análisis Instrumental, 4a. ed., Madrid-España, McGraw-Hill, 1994, pp 109-115

SWEDISH NATIONAL FOOD ADMINISTRATION., Estudio de Validación de Métodos Analíticos, 3a. ed., Madrid-España, 2007, Pp 80-83

WADE DT, ROBSON P, HOUSE H, MAKELA P, ARAM J., A preliminary controlled study to determine whether whole-plant cannabis extracts can improve intractable neurogenic symptoms. *Clin Rehabil*., 4ª. ed., National Library of Medicine USA, 2003, Pp17: 21-29

WILLIAMSON EM, EVANS F, Cannabinoids in clinical practice. DrugsMolecular Interventions American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000, Pp 60: 1303-14.

EUGENI SEDANO I MONASTERIO, Butlletí d'informació terapèutica del Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya., Generalitat de Catalunya Departament de SanitatCatalunya, Volumen 13, 2001, Pp 32-54

GROTENHERMEN F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. Clin Pharmacokine, Springer International Publishing AG,. Volumen 102. 2003, Pp 42: 327-60.

PGR. Manual de identificación de estupefacientes y psicotrópicos. 2. ed. Árbol Editorial. México-México 1998 pp 23-30

MANUAL DE IDENTIFICACIÓN DE ESTUPEFACIENTES Y PSICOTRÓPICOS, INSTITUTO DE CAPACITACIÓN DE LA PGR, MÉXICO, Uso terapèutico del cannabis. 2007.

URL: http://w3.icf.uab.es/ficf/es/bin/view/Cannabis/FarmacologiaBasica#Absorci_n

MANUAL DE DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA CANNABIS SATIVA. Marshall 2012.

URL: <http://www.tecnicoagricola.es/descripcion-de-la-planta-cannabis-sativa/>

ANEXOS

Anexo A. Análisis de Estándares mediante Cromatografía de gases por sextuplicado

		Tr	ÁREA	PROMEDIO	Tr	AREA
ST 1.1	CBD	0,533	0,2365			
	THC	1,716	0,1220			
ST 1.2	CBD	0,716	0,2365			
	THC	1,700	0,1220			
ST 1.3	CBD	0,700	0,2630	CBD	0,6468	0,2453
	THC	1,716	0,1320	THC	1,7080	0,1323
ST 1.4	CBD	0,600	0,2365			
	THC	1,716	0,1520			
ST 1.5	CBD	0,666	0,2365			
	THC	1,700	0,1350			
ST 1.6	CBD	0,666	0,2630			
	THC	1,700	0,1308			
ST 2.1	CBD	0,600	0,2365			
	THC	1,716	0,3109			
ST 2.2	CBD	0,666	0,2365			
	THC	1,700	0,3109			
ST 2.3	CBD	0,700	0,3140	CBD	0,6553	0,2623
	THC	1,700	0,3108	THC	1,7053	0,3087
ST 2.4	CBD	0,600	0,2365			
	THC	1,716	0,3020			
ST 2.5	CBD	0,666	0,2365			
	THC	1,700	0,3090			
ST 2.6	CBD	0,700	0,3140			
	THC	1,700	0,3085			
ST 3.1	CBD	0,450	0,3190			
	THC	1,683	0,4900			
ST 3.2	CBD	0,666	0,3570			
	THC	1,700	0,5470			

ST 3.3	CBD	0,450	0,5080	CBD	0,5720	0,3695
	THC	1,700	0,5460	THC	1,6943	0,5278
ST 3.4	CBD	0,750	0,3570			
	THC	1,700	0,5470			
ST 3.5	CBD	0,450	0,3190			
	THC	1,683	0,4900			
ST 3.6	CBD	0,666	0,3570			
	THC	1,700	0,5470			
ST 4.1	CBD	0,583	0,4630			
	THC	1,683	0,7390			
ST 4.2	CBD	0,516	0,5010			
	THC	1,700	0,7270			
ST 4.3	CBD	0,583	0,5080	CBD	0,6185	0,4777
	THC	1,666	0,7392	THC	1,6830	0,7460
ST 4.4	CBD	0,700	0,4300			
	THC	1,666	0,7570			
ST 4.5	CBD	0,533	0,4630			
	THC	1,700	0,7570			
ST 4.6	CBD	0,796	0,5010			
	THC	1,683	0,7570			
ST 5.1	CBD	0,917	0,6300			
	THC	1,780	0,9020			
ST 5.2	CBD	0,750	0,6050			
	THC	1,666	0,9650			
ST 5.3	CBD	0,583	0,6080	CBD	0,7131	0,6143
	THC	1,666	0,9620	THC	1,6935	0,9475
ST 5.4	CBD	0,700	0,6300			
	THC	1,666	0,9570			
ST 5.5	CBD	0,533	0,6050			
	THC	1,700	0,9570			
ST 5.6	CBD	0,796	0,6080			
	THC	1,683	0,9420			
ST 6.1	CBD	0,583	0,8130			
	THC	1,780	0,9915			

ST 6.2	CBD	0,750	0,8350			
	THC	1,700	0,9890			
ST 6.3	CBD	0,583	0,7640	CBD	0,6575	0,8078
	THC	1,666	1,0865	THC	1,7048	1,1579
ST 6.4	CBD	0,700	0,8070			
	THC	1,700	1,0825			
ST 6.5	CBD	0,533	0,8117			
	THC	1,700	1,3990			
ST 6.6	CBD	0,796	0,8160			
	THC	1,683	1,3990			
ST 7.1	CBD	0,583	0,8560			
	THC	1,683	1,4049			
ST 7.2	CBD	0,750	0,8850			
	THC	1,700	1,4065			
ST 7.3	CBD	0,583	0,9640	CBD	0,6957	0,9080
	THC	1,666	1,4045	THC	1,6887	1,4046
ST 7.4	CBD	0,796	0,9070			
	THC	1,700	1,4025			
ST 7.5	CBD	0,666	0,8800			
	THC	1,700	1,4049			
ST 7.6	CBD	0,796	0,9560			
	THC	1,683	1,4045			
ST 8.1	CBD	0,766	2,3070			
	THC	1,700	1,6525			
ST 8.2	CBD	0,796	2,2800			
	THC	1,700	1,6010			
ST 8.3	CBD	0,806	2,0988	CBD	0,7877	2,2398
	THC	1,716	1,6500	THC	1,7053	1,6372
ST 8.4	CBD	0,796	2,3070			
	THC	1,700	1,6525			
ST 8.5	CBD	0,766	2,2800			
	THC	1,700	1,6010			
ST 8.6	CBD	0,796	2,1660			
	THC	1,716	1,6660			

*Anexo B. Estándar Interno (Tetracosano)
analizado por Cromatografía de Gases
por sextuplicado*

ST Interno	Tr	AREA
1	2,083	0,1103
2	2,000	0,1371
3	1,950	0,1034
4	2,083	0,1140
5	2,000	0,1327
6	2,000	0,1264
Promedio	2,019	0,12065

*Anexo C. Relación de áreas de THC del
Estándar con el área del Estándar Interno*

ST	Área de ST	Relación de áreas
		(Área ST/ Área ST Interno)
1	0,1323	1,0965
2	0,3087	2,5586
3	0,5278	4,3746
4	0,7460	6,1832
5	0,9475	7,8533
6	1,1579	9,5972
7	1,4046	11,6419
8	1,6372	13,5698

Anexo D. Concentración de muestras incautadas examinadas por Cromatografía de gases

MUESTRA	Tr	ÁREA	CONCENTRACIÓN
1	1,733	307,797	0,7036
2	1,816	989,333	2,2306
3	1,733	307,797	0,7036
4	1,717	704,563	1,5925
5	1,700	977,549	2,2042
6	1,700	948,603	2,1393
7	1,733	1370,250	3,0840
8	1,700	554,027	1,2553
9	1,733	810,244	1,8293
10	1,716	855,131	1,9299
11	1,716	765,604	1,7293
12	1,733	673,908	1,5239
13	1,716	128,182	0,3012
14	1,666	1586,615	3,5688
15	1,716	753,120	1,7013
16	1,716	658,117	1,4885
17	1,700	936,9795	2,1133
18	1,700	337,349	0,7698
19	1,700	883,691	1,9939
20	1,683	857,979	1,9363
21	1,700	986,884	2,2251
22	1,666	998,553	2,2512
23	1,683	272,984	0,6256
24	1,683	984,638	2,2201
25	1,683	999,809	2,2540
26	1,666	846,630	1,9109
27	1,683	994,494	2,2421
28	1,700	1699,141	3,8209
PROMEDIO	1,710	828,213	52,3484

Anexo E. Muestras incautadas por el departamento de Criminalística de la Provincia de Chimborazo 1



Anexo F. Muestras Rotuladas



Anexo G. Trituración de las muestras



Anexo H. Filtración de la muestra



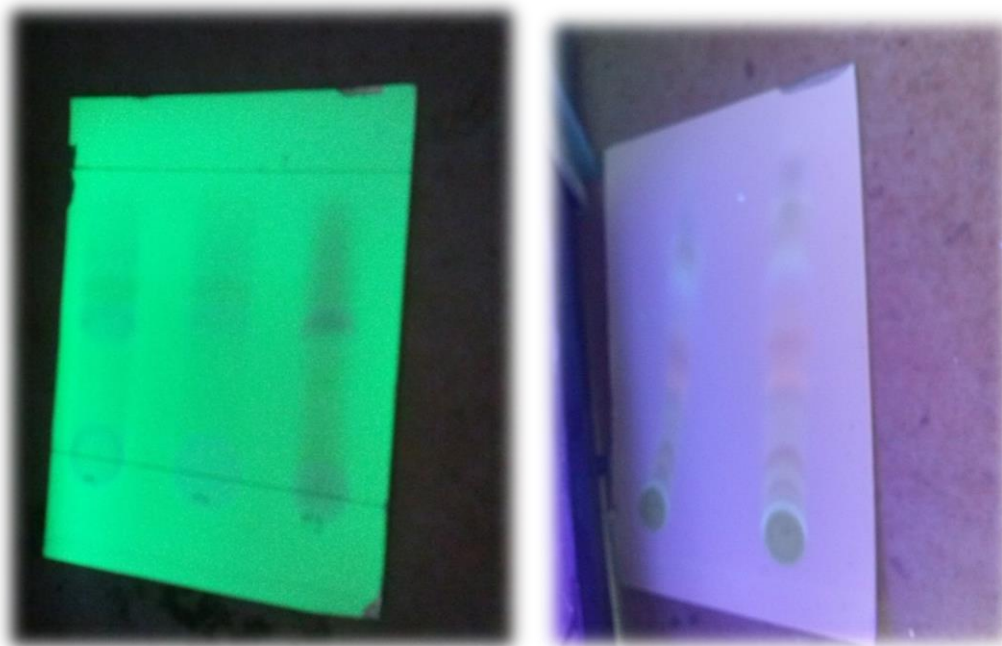
Anexo I. Separación de las fases



Anexo J. Cromatografía en Capa Fina de Cannabinoides a luz normal



Anexo K. Cromatografía en Capa Fina vista con UV a 254 y 366nm respectivamente



Anexo L. Cromatógrafo de Gases



Anexo M. Horno y Columna Cromatografía



Anexo N. Cámara de Hidrogeno

