



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA**

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA
ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN EN
CONJUNTO DE MARIHUANA Y COCAÍNA EN
PELO POR CROMATOGRFÍA GASEOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN
EL SERVICIO MÉDICO LEGAL DE CONCEPCIÓN**

POR LASTENIA TERESA FUENTES ESPINAZA

**Seminario de internado presentado a la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Químico
Farmacéutico**

**Profesor Patrocinante: Dr. Claudio Müller Ramírez
Departamento de Farmacia
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción**

**Profesional Guía: QF. Alejandro Guzmán Rojas
Laboratorio de Toxicología
Servicio Médico Legal**

Junio, 2020

Concepción, Chile



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA**

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA
ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN EN
CONJUNTO DE MARIHUANA Y COCAÍNA EN
PELO POR CROMATOGRFÍA GASEOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN
EL SERVICIO MÉDICO LEGAL DE CONCEPCIÓN**

POR LASTENIA TERESA FUENTES ESPINAZA

**Seminario de internado presentado a la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Químico
Farmacéutico**

**Profesor Patrocinante: Dr. Claudio Müller Ramírez
Departamento de Farmacia
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción**

**Profesional Guía: QF. Alejandro Guzmán Rojas
Laboratorio de Toxicología
Servicio Médico Legal**

Junio, 2020

Concepción, Chile

Ninguna parte de este documento puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.



AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mis padres por ser el pilar en mi vida, por su entrega, sus noches de desvelo y todo lo que han sacrificado para que yo alcance mis sueños, a todos los profesionales que fueron parte de mi formación a través de estos años, en especial al Dr. Claudio Müller por depositar su confianza en mí y acompañarme en esta la última etapa; a todo el equipo que conforma la Facultad de Farmacia por la disposición que siempre presentaron ante cualquier inquietud que presentara; al Servicio Médico Legal de Concepción por brindarme la oportunidad de desarrollar mi habilitación profesional en sus instalaciones, por la educación brindada y en especial al equipo del laboratorio forense por ser un ejemplo en compromiso con su profesión; y por último y no menos importante a todos mis amigos y familiares que durante estos años han brindado una palabra de aliento cuando se necesitaba, la compañía en las noches de estudio y su cariño.

A todos muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Rol del Servicio Médico Legal.....	1
1.2 Epidemiología del consumo de drogas en Chile.....	2
1.3 Característica de la Marihuana	5
1.3.1 Compuestos activos del <i>cannabis</i>	6
1.3.2 Toxicología del Cannabis	7
1.4 Características de la Cocaína.....	10
1.4.2 Toxicología y compuestos activos de la cocaína.....	11
1.5 Planteamiento y justificación del trabajo de seminario	14
1.6.1 Matriz pelo.....	15
2. OBJETIVOS	41
OBJETIVO GENERAL.....	41
OBJETIVOS ESPECIFICOS	41
3.MATERIALES Y METODOS	42
3.1 MATERIALES.....	42
3.1.1 Equipos	42
3.1.2 Materiales.....	42
3.1.3 Reactivos y solventes.....	43
3.1.4 Otros.....	44
3.2 METODOLOGÍA.....	45
3.2.1 Consideraciones generales.....	47
3.2.2 Metodología para el Objetivo N°1.....	49
3.2.3 Metodología para el Objetivo N° 2.....	58
3.2.4 Metodología para el Objetivo N°3.....	74

3.2.5 Metodología para el Objetivo N°4.....	77
3.2.6 Curvas de Calibración	80
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	83
4.1 Resultados y discusión para el Objetivo N°1	85
4.1.1 Volumen y Tipo de inyección.....	85
4.1.2 Extracción mediante columnas <i>Bond Elut Certify®</i>	99
4.2 Resultados y discusión para el Objetivo N°2	104
4.2.1 Resultados y discusión para la primera parte: Contaminación externa del cabello y lavados según protocolo del SML Concepción.....	105
4.2.3 Resultados y discusión para la tercera parte: Pruebas de contaminación externa y variaciones del lavado	111
4.3 Resultados y discusión para el Objetivo N° 3	120
4.4 Resultados y discusión para el Objetivo N°4	127
5. CONCLUSIÓN.....	138
6. OBSERVACIONES	140
7. REFERENCIAS.....	142
ANEXOS.....	146



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Iones cuantificadores y Cualificadores para Δ^9 -THC-TMS	37
Tabla 3-1. Propiedades fisicoquímicas del Δ^9 -THC (UNODC, 2010)	46
Tabla 3-2: Condiciones Cromatográficas de la metodología previamente desarrollada	49
Tabla 3-4: Volumen de estándares adicionados a cada tubo	52
Tabla 3-4: Detalles de las variaciones a probar en los diversos lavados.....	67
Tabla 3-5: Variaciones aplicadas al Lavado Tipo 3 en comparación a la forma original del Lavado (Forma D)	71
Tabla 4-1: Iones Cualificadores para los metabolitos en estudio	84
Tabla 4-2: Comparación de las Condiciones Cromatográficas empleadas para la metodología desarrollada	85
Tabla 4-3: Área obtenida para el ion 386 de Δ^9 -THC-TMS por la metodología de análisis de Marihuana en pelo, sin matriz pelo, inyectadas en ambos modos de inyección PTV y Splitless.....	86
Tabla 4-4: Áreas obtenida para el ion 386 y 389 correspondientes a Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D ₃ -TMS respectivamente, por la metodología de análisis de Marihuana en pelo, con matriz pelo e inyectadas en modo Splitless.....	89
Tabla 4-5: Promedio de la relación de áreas más desviación estándar obtenida para los oines 386 y 389 correspondientes a Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D ₃ -TMS respectivamente, por la metodología de análisis de Marihuana en pelo, con matriz pelo e inyectadas en modo Splitless por triplicado.....	90

Tabla 4-6: Promedio de la relación de áreas obtenida para el ion 386 y 389 correspondientes a Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D ₃ -TMS respectivamente, por la metodología de análisis de Marihuana en pelo, con matriz pelo e inyectadas en modo Splitless por triplicado en una segunda ocasión.	92
Tabla 4-7: Curva de calibración: Resultados obtenidos del promedio la relación de áreas junto con su desviación estándar y concentración nominal de metodología analítica Análisis de Marihuana en pelo, realizada en tubos de centrifuga para Δ^9 -THC-TMS para estudio de linealidad	94
Tabla 4-8: Curva de calibración para concentraciones bajas: Resultados obtenidos de la relación de áreas, promedio de estas y concentración nominal de metodología analítica Análisis de Marihuana en pelo, realizada en tubos de vidrio para Δ^9 -THC-TMS para estudio de linealidad	95
Tabla 4-9: Resultados para evaluar replicabilidad para Δ^9 -THC-TMS	96
Tabla 4-10: Resultados para evaluar precisión intermedia para Δ^9 -THC-TMS	97
Tabla 4-11: Resultados de Porcentajes de recuperación y porcentajes de error para evaluar exactitud para Δ^9 -THC-TMS	98
Tabla 4-12: Resultados de la medición de pH para los diferentes ácido empleados	99
Tabla 4-13: Detalles del tipo de ácido y volumen aplicado hasta alcanzar el pH 1	100
Tabla 4-14: Áreas obtenida para el ion 386 y 389 correspondientes a Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D ₃ -TMS respectivamente, mediante una extracción en fase sólida, por una combinación de la metodología de análisis de Marihuana en pelo con la metodología de análisis de Marihuana en sangre, (inyectadas en modo Splitless).....	102
Tabla 4-15: Áreas obtenida para el ion 386 y 389 correspondientes a Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D ₃ -TMS respectivamente, mediante una extracción en fase sólida, por una combinación de la metodología de análisis de Marihuana en pelo con la metodología de análisis de marihuana en sangre, (inyectadas en modo Splitless con la fuente de iones completamente limpia).....	103

Tabla 4-16: Curva de calibración para lavados del cabello: Resultados obtenidos de la relación de áreas, promedio de estas y concentración nominal de Δ^9 -THC-TMS para estudio de linealidad.	104
Tabla 4-17: Concentración de Δ^9 -THC-TMS en las muestras de cabello expuestas a contaminación externa con humo de marihuana.	106
Tabla 4-18: Concentración de Δ^9 -THC-TMS en los lavados realizados a las muestras de cabello expuestas a contaminación externa con humo de marihuana.....	107
Tabla 4-19: Concentración de Δ^9 -THC-TMS en los diferentes solventes empleados en el lavado nuevo, por todos los ciclos de lavados a los cuales fueron sometidas de las muestras de cabello expuestas a contaminación externa con humo de marihuana....	110
Tabla 4-20: Concentración de Δ^9 -THC-TMS en las muestras de cabello expuestas a contaminación externa con humo de marihuana.	112
Tabla 4-21: Concentración de Δ^9 -THC-TMS presente en los remanentes de solvente de los lavados de las muestras contaminadas con humo de marihuana por tiempo de exposición.....	114
Tabla 4-22 Concentración de Δ^9 -THC-TMS presente en los remanentes finales de solvente de lavados, para aquellas muestras contaminadas con humo de marihuana, a las cuales se debieron de agregar más lavados.....	115
Tabla 4-23: Concentración de Δ^9 -THC-TMS de los remanentes del Lavado Tipo 3 de las muestras de cabello contaminadas con humo de marihuana.....	115
Tabla 4-24 Concentración de Δ^9 -THC-TMS en las diferentes muestras contaminadas con humo de marihuana, una vez realizada la descontaminación externa por medio de los lavados, y extraídas según la metodología de análisis de marihuana en pelo..	117
Tabla 4-25: Tabla resumen, referente a la cantidad total de lavados que se aplicó a cada muestra y las concentraciones de Δ^9 -THC-TMS, encontradas en sus respectivos análisis..	117

Tabla 4-26: Concentración de Δ^9 -THC-TMS en los remanentes del Lavado Tipo 3 según las variaciones que se aplicaron a este lavado para la muestras Día 4 Tubo 2, de cabello contaminadas con humo de marihuana 119

Tabla 4-27: Curva de calibración: Resultados obtenidos de la relación de áreas, promedio de estas y concentración nominal de metodología analítica Análisis de Marihuana en pelo combinada con el Análisis de Cocaína en pelo, realizada en tubos de centrifuga para Δ^9 -THC-TMS para estudio de linealidad..... 120

Tabla 4-28: Áreas obtenidas de Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS, relación de áreas y concentración real obtenida para la primera prueba de aplicar la metodología en conjunto de Análisis de Cocaína y Marihuana en pelo. 122

Tabla 4-29: Concentraciones de Δ^9 -THC-TMS, su porcentaje de recuperación y porcentaje de error obtenidos de aplicar la metodología en conjunto de Análisis de Cocaína y Marihuana en pelo. 123

Tabla 4-30: Áreas obtenidas de Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS, relación de áreas y concentración real obtenida para tubo de plástico y vidrio por la metodología en conjunto de Análisis de Cocaína y Marihuana en pelo. 125

Tabla 4-31: Áreas obtenidas de Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS, relación de áreas y concentración real obtenida la metodología en conjunto de Análisis de Cocaína y Marihuana en pelo en tubo de plástico. 126

Tabla 4-32: Áreas obtenidas de Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS, relación de áreas y concentración real obtenida por la metodología en conjunto de Análisis de Cocaína y Marihuana en pelo en tubos vidrio..... 126

Tabla 4-33: Información extraída de la base de datos del Servicio Médico Legal 2019 referente a muestras de pelo. 128

Tabla 4-34: Resultados del análisis de las muestras reales para determinar la concentración de los diferentes analitos en estudio analizadas por la Metodología de Análisis en conjunto de Cocaína y Marihuana en pelo. 130

Tabla 4-35: Resultados del análisis de las muestras reales para determinar la concentración de los diferentes analitos en estudio analizados por la Metodología de Análisis de Marihuana en pelo. 131

Tabla 4-36: Tabla comparativa de las concentraciones de Cocaína y BZG obtenidas durante el desarrollo del trabajo con las concentraciones informadas por el Servicio Médico Legal de Concepción..... 134

Tabla 4-37: Resultados del análisis previo a muestras reales para determinar la concentración de Δ^9 -THC-TMS por la Metodología de Análisis en conjunto de Cocaína y Marihuana en pelo.. 135

Tabla 4-38: Resultados de las concentraciones de Δ^9 -THC en muestras reales de consumidores de Marihuana, considerando las muestras sin y con descontaminación de la matriz pelo 137



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ecuación 1-1: Relación de áreas.....	38
Ecuación 3-1: Relación de áreas.....	52
Ecuación 3-2: Ecuación para el cálculo del Porcentaje de Recuperación.....	55
Ecuación 3-3: Ecuación para el cálculo del Porcentaje de error.....	55
Ecuación 3-4: Relación de áreas.....	76
	
Figura 1-1: Ruta metabólica del THC en el organismo.....	8
Figura 1-2: Representación esquemática de un cromatógrafo de gases.....	34
Figura 1-3: Esquema de los componentes de un espectrómetro de masas.	36
Figura 4-1: Comparación de los Cromatograma para la Concentración nominal de 0,5 ng/mg de pelo de Δ^9 -THC-TMS, inyectadas por modo PTV (A) y modo Splitless (B) [tiempo de retención: 12,16 minutos].....	87
Figura 4-2: Comparación de la fragmentación de la Concentración nominal de 0,5 ng/mg de pelo de Δ^9 -THC-TMS, para el ion 386, inyectadas por modo PTV (línea negra) y modo Splitless (línea azul) [tiempo de retención: 12,16 minutos].	87

Figura 4-3: Cromatograma del ion 386 y 389 correspondientes a la Concentración nominal 0,05 ng/mg de pelo para Δ^9 -THC-TMS, y 2 ng/mg de Δ^9 -THC-D₃-TMS (Estándar interno), inyectadas por modo Splitless [tiempo de retención: 12,31 minutos]. 90

Figura 4-4: Cromatograma (A) de la muestra del Tubo 1 de concentración nominal 0,05 ng/mg de pelo para Δ^9 -THC-TMS, y 2 ng/mg de Δ^9 -THC-D₃-TMS (Estándar interno), en donde se puede apreciar que hay una gran cantidad de interferentes en la muestra; en la parte B se aprecia la Fragmentación de los iones correspondientes a Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS y se puede apreciar que la abundancia de los iones 371 y 386 pertenecientes a Δ^9 -THC-TMS son muy bajas [inyección: Splitless, tiempo de retención: 12.16 minutos]. 91

Gráfico 1-1: Evolución Prevalencias de Consumo de Clorhidrato de Cocaína, Chile 1994-2018 (%), [Imagen obtenida de Observatorio Chileno de Drogas, 2018]. 4

Gráfico 1-2: Evolución Prevalencias de Consumo de Marihuana, Chile 1994-2018 (%). [Imagen obtenida de Observatorio Chileno de Drogas, 2018]. 4

Gráfico 4-1: Curva de calibración para Δ^9 -THC, realizada en tubos de centrifuga por la metodología de análisis de Marihuana en pelo. 94

Gráfico 4-2: Parte baja de la Curva de calibración para Δ^9 -THC, realizada en tubos de centrifuga por la metodología de análisis de Marihuana en pelo. 95

Gráfico 4-3: Curva de calibración para bajas concentraciones de Δ^9 -THC, realizada en tubos de vidrio por la metodología de análisis de Marihuana en pelo. 96

Gráfico 4-4: Curva de calibración de Δ^9 -THC-TMS para lavados de cabello. . 105

Gráfico 4-5: Curva de calibración para el método en conjunto de Cocaína y marihuana..... 121



RESUMEN

Los analitos Marihuana y Cocaína son las drogas ilícitas más consumidas por parte de la población chilena, por ello surge la necesidad de un análisis que permita medir cronicidad de consumo en el tiempo. La matriz pelo, debido a su naturaleza, permite realizarlo, medido en el intervalo de meses a años, para ello el Servicio Médico Legal Concepción, desde hace algún tiempo realiza análisis de Cocaína en pelo, pero el análisis de Marihuana en pelo aún no está implementado. Este trabajo pretende optimizar el tiempo de trabajo, al poder realizar ambos análisis en conjunto desde una misma muestra de cabello siguiendo las recomendaciones que hace la *Society of Hair Testing* (SoHT), por medio de una descontaminación adecuada del cabello, con una extracción en fase sólida y una inyección en modo Splitless por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

En conclusión no fue posible implementar una metodología analítica para la determinación de marihuana y cocaína en conjunto en matriz pelo por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, pero si se sientan las bases y se abre a la posibilidad de poder emplearlo.

ABSTRACT

The analytes Marijuana and Cocaine are the most consumed illicit drugs by the Chilean population, therefore the need for an analysis that allows measuring chronicity of consumption over time arises. The hair matrix, due to its nature, allows it to be carried out, measured in the interval from months to years, for which the Servicio Médico Legal de Concepción, has for some time carried out analysis of Cocaine in hair, but the analysis of Marijuana in hair is not yet implemented. This work aims to optimize the working time, by being able to carry out both analyzes together from the same hair sample following the recommendations made by the Society of Hair Testing (SoHT), by means of adequate decontamination of the hair, with a phase extraction Solid and a Splitless mode injection by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

In conclusion, it was not possible to implement an analytical methodology for the determination of marijuana and cocaine together in a hair matrix by gas chromatography coupled to mass spectrometry, but the foundations are laid and it opens up to the possibility of using it.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **11-nor-THC-COOH**: 11-nor-9-carboxi-THC
- **11-OH-THC**: 11-hidroxi-THC
- **BSTFA**: N,O-bis (Trimetilsilil) Trifluoroacetamida
- **BZG**: Benzoilecgonina
- **CBD**: Cannabidiol
- **CBN**: Cannabinol
- **COC**: Cocaína
- **FDA**: Food and Drug Administration
- **GC-MS**: Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas
- **ISP**: Instituto de Salud Pública de Chile
- **LC**: Cromatografía Líquida
- **LLE**: Extracción Líquido-Líquido
- **SENDA**: Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol.
- **SML**: Servicio Médico Legal.
- **SNC**: Sistema Nervioso Central
- **SoHT**: Society of Hair Testing
- **SPE**: Extracción en Fase Sólida
- **TMS**: Trimetilsilil
- **Δ^9 -THC**: Δ^9 -Tetrahidrocannabinol
- **Δ^9 -THC-D₃**: Δ^9 -Tetrahidrocannabinol deuterado

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Rol del Servicio Médico Legal

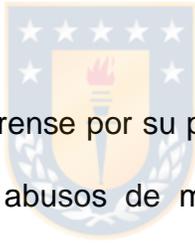
El Servicio Médico Legal es un servicio público chileno, creado en el año 1915, dependiente del Ministerio de Justicia y Derechos Humanos, que asesora técnicamente a los Tribunales de Justicia y al Ministerio Público en materias médico-legales, colaborará con las Cátedras de Medicina Legal de las Universidades del país, y posee un museo con colecciones de piezas y objetos relacionados con la Medicina Legal, y las demás labores que le encomienden las leyes. (Servicio Médico Legal, 2019).

Esta entidad realiza peritajes clínicos, pericias de salud mental, peritajes tanatológicos, registro nacional de ADN, laboratorio CODIS, unidad especial de identificación forense y peritajes de laboratorio. (Servicio Médico Legal, 2019).

En especial el Servicio Médico Legal de Concepción está conformado por 5 departamentos: Departamento de Clínica, Departamento de Salud Mental, Departamento de Tanatología, Departamento de Antropología y Departamento de Laboratorio Forense, siendo estos dos últimos, centro referencial de la Zona Sur.

A su vez el Departamento de Laboratorio Forense está conformado por un conjunto de diversos profesionales tales como Químicos Farmacéuticos, Bioquímicos y Técnicos de laboratorio, los cuales para llevar a cabo su labor se subdividen en 5 secciones:

- Unidad de Recepción de muestras (URM)
- Alcoholemia
- Bioquímica y Criminalística
- Unidad de Genética Forense
- Toxicología Forense



La unidad de Toxicología Forense por su parte, está encargada de la detección de presencia de drogas o abusos de medicamentos y tóxicos en general, (Servicio Médico Legal, 2019) en diversas matrices, en donde la principal es sangre, seguida por orina, vísceras, humor vítreo entre otras, encontrando diversos analitos de los que destacan drogas de abuso tales como marihuana, cocaína, y medicamentos tales como benzodiazepinas, anfetaminas entre otros.

1.2 Epidemiología del consumo de drogas en Chile

Droga es toda sustancia natural o sintética capaz de alterar la actividad psíquica (conducta, pensamiento, emoción) del individuo que la consume. Hay distintas

drogas y el uso de cada una de ellas tiene distintas consecuencias a nivel individual, familiar y social.

Las drogas ilegales más consumidas en Chile son la marihuana, la cocaína y hachís, seguido de pasta base, sumado a un alza en el consumo de Analgésicos y Tranquilizantes sin receta médica. (Observatorio Chileno de Drogas, 2018). El siguiente trabajo se enfocó principalmente en las dos primeras drogas, marihuana y cocaína. Para ser más específicos el Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA), publicó en el año 2019 la estadística de consumo de estas drogas por parte de la población chilena, como se puede ver en los Gráficos 1-1 y 1-2, donde se observa un leve descenso en comparación a años anteriores, considerando el parámetro “consumo en el último año”, representado como “Año”, el que utiliza dicho organismo, para realizar sus declaraciones.

Los demás marcadores corresponden a “consumo alguna vez en la vida” representado en el gráfico como “Vida”, y “consumo en el último mes” representado como “Mes”. (Observatorio Chileno de Drogas, 2018).

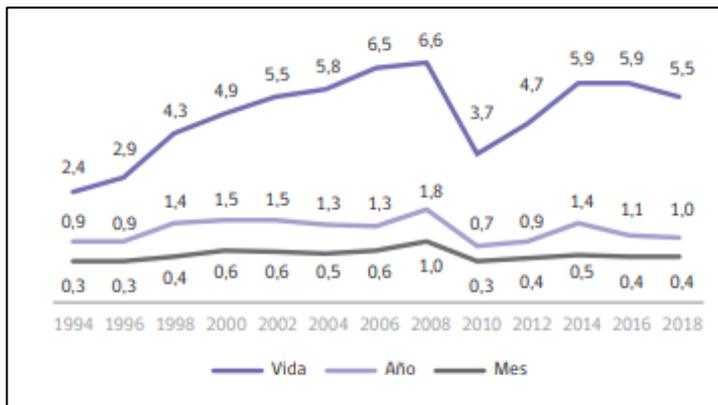


Gráfico 1-1: Evolución Prevalencias de Consumo de Clorhidrato de Cocaína, Chile 1994-2018 (%), [Imagen obtenida de Observatorio Chileno de Drogas, 2018].

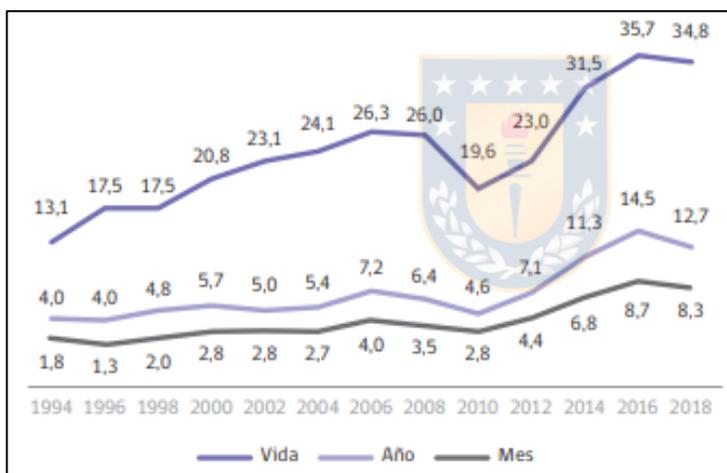


Gráfico 1-2: Evolución Prevalencias de Consumo de Marihuana, Chile 1994-2018 (%). [Imagen obtenida de Observatorio Chileno de Drogas, 2018].

Si bien la tendencia nacional es a la baja, ambos gráficos nos muestran que parte de la población chilena es consumidora de alguna sustancia ilícita y por ello es tan importante realizar análisis relativamente nuevos en relación a la determinación de ambos analitos.

1.3 Característica de la Marihuana

La marihuana es una planta dioica originaria de Asia central que crece en zonas tropicales y de clima templado (Escobar et al, 2009), entre uno y dos metros de altura, con hojas palmiformes de cinco a siete segmentos largos y muy dentados. Las plantas son unisexuales, la planta femenina presenta sus flores envueltas en vaina y es mucho más frondosa, mientras que la planta masculina presenta sus flores en panículos terminales y se seca rápidamente. Esta planta es sumamente resistente y adaptable (Figuroa et al. Capítulo 1 2015). Pertenece a la familia *Cannabaceae*, género *Cannabis*, y las principales especies con actividad psicoactiva y narcótica son *C. sativa* y *C. indica* (Escobar et al, 2009).

En la actualidad se conocen más de 350 nombres para designar la planta y las preparaciones. Estas últimas pueden ser de tres tipos: para fumar, beber o comer. Los productos para ser fumados (forma más habitual de consumo en nuestro medio) consisten en cigarrillos preparados a base de hojas, botones florales y tallos (Escobar et al, 2009), en ocasiones mediante una pipa (Glosario de Términos, marihuana, SENDA, 2019) cuyo contenido de psicoactivos es variable. (Escobar et al, 2009).

1.3.1 Compuestos activos del *cannabis*

La marihuana que se obtiene de la planta de cannabis, contiene más de 421 componentes químicos, que se transforman en más de 2.000 al fumarla, de ellos más de 61 de estas sustancias se llaman cannabinoides y sólo se encuentran en esta planta. Los compuestos cannabinoides constituyen una serie de sustancias de naturaleza fenólica, derivados del difenilo y del benzopirano. A este grupo pertenece una serie de isómeros del tetrahidrocannabinol (THC), como lo es el Δ^1 -THC, Δ^6 -THC y el Δ^9 -THC; otros compuestos cannabinoides que posee la planta son el cannabidiol, cannabinol, cannabigerol, cannabicitrol, cannabicromeno y otros compuestos de naturaleza ácida como ácido cannabidiólico y ácido cannabinólico. Además de cannabinoides, también posee algunos alcaloides simples como la nicotina y aceites esenciales. Los cannabinoides que se encuentran en mayor proporción en la planta son el Δ^9 -THC, principal causante de los efectos psicoactivos de esta droga, el Cannabidiol (CBD) que es un constituyente no psicoactivo pero abundante en distintos tipos de fibra y finalmente el cannabinol (CBN) que es el que se encuentra en menor cantidad cuando se trata de plantas frescas, pero que al aplicar fuego para fumar la marihuana se transformaría en THC nuevamente. (Figuroa et al. Capítulo 1 2015).

Actualmente el THC contenido en las plantas es mucho más alto que en décadas anteriores, lo cual lo transforma en más tóxico de lo que se cree. A esto se suma el hecho de que en la actualidad es común la marihuana prensada que contiene aditivos químicos, solventes y otras sustancias que provocan daños anexos. (Glosario de Términos, marihuana, SENDA, 2019).

1.3.2 Toxicología del Cannabis

De acuerdo a lo que se ha planteado en la literatura, la vía de administración más común de cannabis es a través de la vía inhalatoria, es decir, fumada; y ocasionalmente se ingiere ya sea en alimentos o aceites. De acuerdo a su toxicocinética, el compuesto THC es ampliamente metabolizado y menos del 1% del THC no sufre cambios durante su metabolismo y es excretado en orina. Cuando la cannabis es inhalada, cerca del 50% del THC es absorbido por los pulmones, llegando rápidamente al torrente sanguíneo y así alcanzando en pocos minutos al cerebro; cuando la administración es vía oral, su biodisponibilidad es menor que la inhalatoria, llegando a alcanzar entre un 25 a 30% de THC en la sangre, debido a que sufre metabolismo de primer paso en el hígado. Para determinar estos cannabinoides en muestras biológicas, es necesario conocer la ruta de metabolización. La Figura 1-1 muestra los

metabolitos del THC en el organismo. (Figuerola et al. Capítulos 1, 2015)

(Figuerola et al. Capítulos 2, 2015)

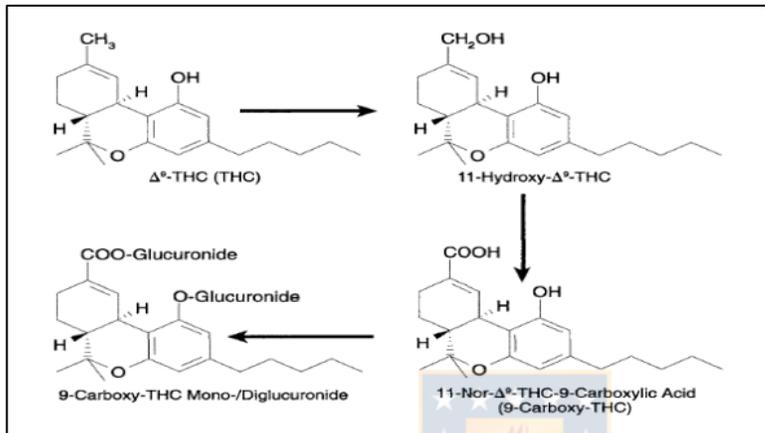


Figura 1-1: Ruta metabólica del THC en el organismo. [Muestra recuperada de: Figuerola et al. Capítulos 1, 2015; Figuerola et al. Capítulos 2, 2015].

Los cannabinoides son metabolizados en el hígado, donde el principal metabolito se denomina 11- hidroxy-THC, este metabolito también presenta efectos psicoactivos y un tiempo de vida media y de eliminación más larga. La hidroxilación es realizada por una enzima monooxigenasa dependiente de oxígeno y del sistema NADP-NADPH que se inhibe con el monóxido de carbono, lo que indica que también interviene el citocromo P-450. La eliminación de los cannabinoides se produce en 25% por vial renal y 65% por vía intestinal. Cabe destacar que debido a las características particulares de los cannabinoides, esto

es: alta retención en los tejidos con mayor contenido graso, y la presencia de metabolitos activos, es que se hace difícil y errático co-relacionar los niveles de concentración entre plasma y orina para establecer el grado de intoxicación del individuo. (Figuroa et al. Capítulos 1, 2015) (Figuroa et al. Capítulos 2, 2015)

Una vez que se ha inhalado cannabis, cerca del 50% es excretado en forma de metabolito, mientras que el otro 50% es distribuido a los diferentes tejidos. De acuerdo a sus características químicas, los cannabinoides son muy liposolubles, lo que les confiere la capacidad de acumularse en los tejidos con alto contenido lipídico, como el tejido adiposo, pulmones, riñones, hígado, corazón, bazo y glándula mamaria, que se comportan como reservorios de THC y explican la elevada duración de éstos en el organismo; por lo que es posible que aún se puedan detectar niveles luego de 4 a 5 días posteriores a su consumo. Además, debido a su característica lipofílica, los cannabinoides tienen un tiempo largo de eliminación, que puede llegar a ser de hasta 7 días para el caso de consumidores crónicos. (Figuroa et al. Capítulos 1, 2015) (Figuroa et al. Capítulos 2, 2015)

El metabolito que se encuentra en mayor abundancia es el ácido 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9- carboxílico (9-carboxy-THC), por ende, la identificación de 9-carboxy-THC en orina es considerada el mejor indicador de consumo de cannabis. La concentración de THC en plasma disminuye rápidamente una vez

que se ha iniciado el metabolismo y su consecuente almacenamiento en el tejido graso. En resumen, el mayor componente psicoactivo de cannabis es Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) es posible detectarlo en sangre, la presencia de este compuesto orienta a un reciente consumo de cannabis. La detección del metabolito hidroxilado (11-OH-THC) puede ser interpretado como el consumo próximo en el tiempo, mientras que el metabolito carboxilado (THC-COOH) es posible identificarlo tanto en orina como en sangre hasta 7 días después del consumo de cannabis; incluso con el consumo regular, el THC-COOH se puede detectar en plasma después de varias semanas tras el último consumo. (Figueroa et al. Capítulos 1, 2015) (Figueroa et al. Capítulos 2, 2015) (Grotenhermen, 2002)



1.4 Características de la Cocaína

La cocaína, alcaloide que se extrae de las hojas de coca (*Erythroxylon coca*), planta que se cultiva en el altiplano andino (*Glosario de Términos, cocaína, SENDA, 2019*). Pertenece, al grupo de drogas simpaticomiméticas y estimulantes del Sistema Nervioso Central. La cocaína varía su contenido de alcaloide según las regiones y las distintas variedades de la planta; únicamente dos se utilizan para la elaboración de la cocaína: la *Erythroxylon novogranatense* y la *Erythroxylon coca*. En el caso de la primera, también es conocida como la “coca peruana”. En el caso de la segunda, la variedad coca, es llamada también “coca

boliviana”. Existen entre ellas otras variedades como la *E. ipadu*, la *E. truxillense*. Si bien entre las variedades mencionadas la proporción de alcaloides por hoja de coca es casi la misma, el porcentaje del alcaloide cocaína difiere en algún grado: la variedad *Erythroxylon coca*, cuenta con hojas que contienen cerca de un uno por ciento de alcaloides, mientras que la denominada *E. novogranatense*, el porcentaje del alcaloide cocaína es menor. (Damin 2015). En Chile, se consume como clorhidrato de cocaína (cocaína) que tiene la apariencia de polvo blanco cristalino, y como sulfato de cocaína (pasta base) que se obtiene de las hojas de coca maceradas o pulverizadas, que son tratadas con ciertos solventes como parafina, bencina, éter o ácido sulfúrico. Debido a que los solventes son sustancias tóxicas, la pasta base es más dañina que el clorhidrato de cocaína, que sólo contiene el alcaloide. En Chile, normalmente la pasta base se combina con tabaco o marihuana. (Velásquez, 2004)

1.4.2 Toxicología y compuestos activos de la cocaína

Respecto a su Toxicocinética, la absorción está determinada por la forma química, se absorbe por todas las vías (oral, rectal, vaginal, intravenosa, intranasal, inhalatoria), las principales son aspiración nasal (intranasal) o por vía intravenosa. Respecto al metabolismo la cocaína sufre un proceso de hidrólisis por las esterasas plasmáticas y hepáticas a benzoilecgonina (principal

metabolito) y a metilester de ecgonina, que se eliminan por orina. Otros metabolitos, en cantidades menores, no son significativos en la producción de un cuadro clínico a excepción del cocaetileno, metabolito que se va a generar a partir de la transesterificación hepática en cantidades menores al 5%. Si el usuario de cocaína consume conjuntamente alcohol etílico, las cantidades que se generan aumentarán significativamente. La importancia de este metabolito radica en que posee actividad cardiotoxica y hepatotóxica, incrementando el riesgo de muerte súbita por cocaína de 18 a 20 veces. Dentro de su excreción del 10 al 20% se excreta sin cambios. La vida media plasmática ($t_{1/2}$) es de 60 minutos aproximadamente (aunque algunos autores sostienen que es de 60 a 180 minutos, dependiendo del metabolito) y su volumen de distribución de 1,2 a 1,9 L/kg. El metabolito que se detectará en orina usualmente será la benzoilecgonina, siendo posible detectarlo de 3 a 5 días posteriores al último consumo, dependiendo de la cantidad consumida, de la vía, de la habitualidad del usuario y de la sensibilidad del método analítico. También puede determinarse en sangre y en pelo. (Damin, 2015)

El “Clorhidrato de cocaína”, como se mencionó anteriormente es la forma más difundida en Chile, se presenta como un polvo cristalino blanco, que suele estar adulterada con muchos compuestos, con la propiedad común de ser polvos blancos. Soluble en soluciones acuosas, que se descompone antes de alcanzar

el punto de ebullición por lo que no se puede fumar. Se administra por aspiración nasal o por vía intravenosa. Por ambas vías, la velocidad de los efectos es rápida. La máxima concentración plasmática se produce a los 5 minutos para la administración intranasal y la duración de los efectos se prolonga por alrededor de 60 minutos, mientras que por vía intravenosa, la concentración plasmática máxima es alrededor de los 30 segundos, durando sus efectos por 10 a 20 minutos. (Damin, 2015).

En relación a su toxicodinamia las acciones más importantes de la cocaína son:

1. Inhibición de la recaptación presináptica de noradrenalina: esto produce un efecto simpaticomimético y es responsable de la mayoría de las complicaciones agudas de la cocaína.
2. Estimulación de la liberación de dopamina: También disminuye la recaptación presináptica de dopamina. Este efecto produce estimulación del Sistema Nervioso Central.
3. Bloqueo de la reabsorción de serotonina: esto lleva a la reducción de la concentración de serotonina y sus metabolitos con lo que reduciría la necesidad fisiológica del sueño.

4. Disminución de la permeabilidad de la membrana a los iones de sodio en los tejidos neuronales: ello produce el efecto anestésico (bloqueo de la conducción nerviosa) y es responsable de la depresión del SNC. (Damin, 2015)

1.5 Planteamiento y justificación del trabajo de seminario

Como se dijo anteriormente, el Servicio Médico Legal (SML) asesora a los Tribunales de Justicia y al Ministerio Público en materias médico-legales, y dichos analitos (Marihuana y Cocaína) se encuentran principalmente involucrados en muchos de estos casos; ahora bien para el laboratorio de toxicología es importante poder evaluar cronicidad del consumo de Cocaína y Marihuana ya que se piden análisis en el marco de la resolución de casos asociados a tuición de menores asimismo de casos de microtráfico o tráfico de drogas de abuso, y para ello la matriz pelo es importante, ya que su naturaleza permite evaluar el consumo en el tiempo, medido en el intervalo de meses a años, y no solo el consumo reciente como lo permite el resto de matrices (sangre, orina, entre otras).

Cabe señalar que desde hace algún tiempo ya se realiza en el SML el análisis de Cocaína en pelo, pero el análisis de Marihuana en pelo aún no está

implementado, es por eso que se pretende con el siguiente trabajo sentar las bases para poder comenzar a realizar el análisis de Marihuana en pelo, y a su vez optimizar el tiempo de trabajo al poder realizar ambos análisis en conjunto desde una misma muestra de cabello, esto debido a que muchas veces el perito se enfrenta a poca cantidad de muestra, producto de que personas tienen el cabello muy corto, o definitivamente no tienen cabello y se debe tomar muestra de otras zonas como lo son vellos púbicos y axilares, siendo menor la cantidad para someter a ambos análisis por separado.

1.6 Análisis en matriz pelo*

*Este capítulo por su extensión, se dividió en secciones pero en general se basa en 2 referencias principalmente: Lendoiro, 2016 y lo que plantea la *Society of Hair Testing*, 1997, complementado con otras, todo respectivamente indicado.

1.6.1 Matriz pelo

El uso de matrices biológicas alternativas en el ámbito de la Toxicología Clínica y Forense se ha incrementado de forma significativa en los últimos años. Estas matrices complementan la información obtenida con el análisis de las matrices biológicas tradicionales (sangre y orina), y presentan una toma de muestra menos invasiva y más sencilla. El pelo es una matriz biológica alternativa muy útil debido a su amplia ventana de detección, de meses o incluso años, lo que permite realizar el estudio retrospectivo del consumo y establecer el perfil

cronológico del mismo. Sin embargo, se requieren métodos analíticos suficientemente sensibles para su análisis toxicológico, ya que las concentraciones encontradas en esta matriz biológica suelen ser bajas (del orden de pg/mg); además otra desventaja radica en que la posibilidad de un falso positivo es elevada si no se realiza una adecuada descontaminación externa de la muestra. En general, las drogas sin metabolizar se detectan en mayor proporción que sus metabolitos. (Lendoiro, 2016)

1.6.1.1 Características generales del pelo



El pelo es un anexo de la piel característico de los mamíferos, que está formado fundamentalmente por proteínas (65-95%, mayoritariamente queratina), agua (15-35%), lípidos (1-9%) y minerales (< 1%) (Lendoiro, 2016).

El pelo es un tejido sólido muy complejo que se origina en los folículos pilosos. Estos folículos están anclados a unos 3-4 mm de la superficie de la epidermis, y se encuentran vascularizados por una densa red de capilares que los rodean. (Lendoiro, 2016).

El pelo, a diferencia de la orina, no permite la determinación de un consumo reciente; sin embargo, en la práctica, estas dos matrices son complementarias en relación a la información toxicológica que proporcionan. (Lendoiro, 2016).

1.6.1.2 Incorporación de las drogas y fármacos al pelo

La incorporación de las diferentes drogas y fármacos al pelo puede ser explicada a través de un modelo complejo, en el que se acepta la existencia de diversos mecanismos distintos que influyen en la incorporación.

Estos mecanismos son:

1. Difusión pasiva desde la sangre que irriga el folículo e incorporación en la matriz proteica del pelo durante su formación y crecimiento. Esta vía forma la base científica sobre la que se basa el análisis secuencial del pelo, para obtener el perfil cronológico del consumo de drogas.
2. Transferencia desde el sudor y las secreciones de las glándulas sebáceas y apocrinas una vez formado el pelo definitivo.
3. Difusión en la piel, que actúa como reservorio desde la sangre y el sudor y posterior deposición en el pelo.
4. Transferencia de las drogas al pelo desde el ambiente externo: Exposición pasiva a las drogas (Jurado, 2012)

La disposición de las drogas incorporadas al pelo dependerá, por lo tanto, de una combinación entre la velocidad a la que crece y el tiempo que permanece cada folículo en cada una de las fases del ciclo de crecimiento. Estos dos factores

varían, a su vez, en función de diferencias interindividuales como la raza, el sexo y la edad, del tipo de pelo del que se trata y de la localización anatómica del mismo. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

Debido a esta gran variabilidad, el pelo de la región del vértex posterior fue seleccionado como el indicado para la realización de los análisis de drogas. Diferentes estudios han observado que la velocidad de crecimiento en esta zona varía entre 0,6 a 1,4 cm al mes. Como simplificación, se estableció que la velocidad de crecimiento del pelo en esta región es de 1 cm al mes. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

En relación a la incorporación de cannabinoides en el cabello, esta es débil en comparación con sustancias básicas como la cocaína o la metilendioximetanfetamina. (Thorspecken et al., 2004).

1.6.1.3 Protocolos generales de análisis

En el año 2012 la *Society of Hair Testing* (SoHT) estableció una guía de buenas prácticas para aquellos laboratorios que realizasen análisis toxicológicos de pelo. De forma genérica, los pasos necesarios para el análisis toxicológico del pelo son:

1. Recolección de la muestra y almacenamiento.
2. Segmentación del mechón.
3. Eliminación de la contaminación externa.
4. Extracción de los analitos de la matriz.
5. Procesos de purificación.
6. Análisis instrumental. (*Society of Hair Testing*, 1997)

1.6.1.3.1 Recolección de la muestra y almacenamiento

La recogida de muestras de pelo puede realizarse de diferentes regiones anatómicas como el cuero cabelludo, pubis, axila, o cualquier otra zona corporal con pelo. Sin embargo, siempre que esté disponible, se seleccionará preferentemente el cabello como la muestra de elección para el análisis rutinario de drogas, alcohol o medicamentos. La recogida del cabello debe realizarse en la parte posterior de la cabeza conocida como vértex posterior. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

La cantidad de pelo recogida debe ajustarse al número de determinaciones toxicológicas requeridas y a la cantidad de pelo necesario para cada metodología analítica. En general, se recomienda un mechón del diámetro de un lápiz pasta Bic®.

El pelo no requiere condiciones especiales de almacenamiento. Las muestras deben ser conservadas a temperatura ambiente, introducidas simplemente en un sobre de papel, en papel de aluminio, o bien en un tubo de cristal o plástico. Es aconsejable almacenarlas en un lugar seco y oscuro, evitando la luz directa del sol, y no es recomendable guardarlas en la nevera o el congelador. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

1.6.1.3.2 Segmentación del mechón

La segmentación del mechón de pelo permite realizar un estudio del patrón cronológico de consumo, para obtener información sobre el uso de las sustancias a lo largo del tiempo. Sin embargo, no en todos los casos es necesario realizar la segmentación del mechón de pelo, bien porque la naturaleza del caso en estudio no lo aconseja o bien porque el cabello es muy corto (menor a 1 cm). (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

La segmentación del cabello se basa en dos premisas: el crecimiento medio del cabello de un individuo es de 1 cm/mes, y la toma de muestra se realiza cortando el pelo lo más próximo posible al cuero cabelludo. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

El proceso de segmentación debe realizarse con la ayuda de una regla o papel milimetrado que permita medir correctamente la longitud el segmento. Además se recomienda efectuar segmentos de longitud creciente en el análisis de un mechón. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

Esto se debe a que la concentración de las sustancias en un segmento de pelo de un mechón decrece proporcionalmente con el incremento de su distancia desde la raíz. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).



1.6.1.3.3 Eliminación de la contaminación externa

La contaminación externa se compone de una combinación de contaminantes de origen exógeno y de origen endógeno que recubren la parte externa de la fibra pilosa. Los contaminantes exógenos engloban restos de drogas a los que se expone pasivamente el pelo en contacto con ambientes contaminados. Mientras que los contaminantes endógenos son segregados por las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas, y bañan la parte externa de la fibra pilosa en formación. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

La eliminación de esta contaminación externa es un paso previo a realizar antes de cualquier análisis de pelo, tanto para evitar resultados falsos positivos por la posible existencia de contaminantes exógenos, como para evitar interferencias

en la interpretación de los resultados que puedan causar los contaminantes endógenos. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

La eliminación de la contaminación externa se realiza mediante la aplicación de lavados sucesivos en el mechón de pelo o segmento con uno o varios disolventes durante un tiempo determinado. Además de eliminar la contaminación externa propiamente dicha, estos procesos de lavado del pelo también eliminan restos de productos cosméticos como champús, ceras, lacas, etc, que pueden interferir en la posterior determinación analítica de los compuestos de interés. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).



Las recomendaciones generales de la SoHT en relación a la eliminación de la contaminación externa, son:

- Realizar siempre un procedimiento de lavado del pelo antes del análisis.
- El procedimiento de lavado debe realizarse con disolventes orgánicos y acuosos.
- El laboratorio debe investigar el grado de eliminación de la contaminación externa que produce su método de lavado.
- Aquellos cabellos que estén altamente impregnados de fluidos biológicos pueden requerir pasos adicionales de lavado. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

Por tanto, y siguiendo estos criterios, se han desarrollado numerosas metodologías. En la mayoría de estas metodologías se incluyen tanto disolventes orgánicos como acuosos. Sin embargo, está generalmente aceptado que los disolventes orgánicos como el diclorometano (solvente empleado en el SML) y la acetona tan sólo eliminan la contaminación superficial de la fibra de pelo, mientras que las disoluciones acuosas y el metanol también extraen parte de las drogas incorporadas en el pelo. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

Una vez eliminada la contaminación externa es importante comprobar que el método de lavado ha sido efectivo y la concentración encontrada se corresponde con la cantidad de droga que había sido incorporada en el interior del pelo desde la sangre. Para ello, se han establecido varios criterios:

- Análisis del último lavado y su comparación con los niveles de analitos detectados en el análisis del pelo.
- Detección de metabolitos.
- Uso de *cut-offs* o niveles de corte. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

1.6.1.3.4 Extracción de los analitos de la matriz

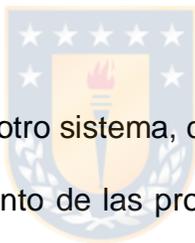
El pelo es una matriz sólida y, debido a ello, las drogas que han sido incorporadas desde la sangre hacia su interior se encuentran firmemente unidas a las proteínas, a la melanina y/o a los lípidos que forman su estructura, por uniones covalentes. (Jurado, 2012).

Por ello es necesario realizar, previo al análisis, un procedimiento de extracción de estos analitos de la matriz sólida, que libere las drogas y permita su análisis. La eficacia de esta extracción dependerá de diversos factores como son: el estado de conservación de la matriz, la estructura química de los analitos, la polaridad del disolvente empleado, y la duración y forma de extracción. El proceso de extracción incluye un primer paso de homogenización de la muestra y un segundo paso de extracción mediante la solubilización los analitos con un disolvente que penetre en el interior de la fibra pilosa, o mediante la digestión de la matriz del pelo. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

La homogenización puede efectuarse mediante el corte del pelo en pequeños fragmentos de 1-3 mm o por pulverización del mismo hasta obtener un polvo fino. Estas acciones aumentan la superficie de contacto entre el pelo y el disolvente usado en la extracción de los analitos y, por tanto, maximizan la extracción de los mismos. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

Varias publicaciones han recomendado la pulverización del pelo como el sistema con mayor recuperación en comparación con aquellas técnicas que emplean el pelo sólo cortado. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

Una vez homogeneizado el pelo, se realiza la extracción por solubilización o digestión. Se ha observado que la completa digestión de la matriz permite obtener una mejor recuperación de los analitos, pero las técnicas empleadas para ello suelen ser más agresivas y los extractos obtenidos tienen más impurezas e interferentes. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).



Para la elección entre uno u otro sistema, deben tenerse en cuenta una serie de parámetros fisicoquímicos tanto de las propias sustancias a extraer (estructura de las moléculas) como de los disolventes empleados para ello (polaridad). (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

La extracción de los analitos suele hacerse con una de las cuatro formas que se presentan a continuación:

- Disolventes orgánicos,
- Tampones ácidos,
- Tampones básicos o
- Digestión enzimática (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

La solubilización o la digestión del pelo suele realizarse acompañada de una incubación con calor de los extractos o bien de una extracción con ultrasonidos. La incubación con calor causa una mayor solubilización de los compuestos en el disolvente y la ultrasonificación causa una alta degradación de la estructura del pelo y por ello, favorecen el proceso de extracción. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

1.6.1.3.5 Procesos de purificación

Debido a que el pelo es una matriz compleja, los extractos obtenidos después de la extracción de los analitos de la matriz del pelo deben ser sometidos a un proceso de purificación que elimine los interferentes y concentre las sustancias para su posterior análisis. Aunque es posible encontrar en la bibliografía algunos trabajos en los que el extracto es directamente inyectado en el cromatógrafo de líquidos acoplado a espectrometría de masas en tándem (LC-MSMS) o el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), en general, es recomendable hacer un paso previo de limpieza y concentración de los compuestos para eliminar impurezas e interferentes. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

El proceso de purificación al que se someten los extractos es similar al que se emplea para la determinación de drogas en sangre u orina. Los métodos más empleados para este fin son la extracción líquido-líquido (LLE, *Liquid Liquid Extraction*) y la extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*). (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

Generalmente, los métodos SPE son los más usados debido a que producen extractos más limpios, tienen una mayor selectividad y reproducibilidad, y evitan la formación de emulsiones, comparados con los métodos de LLE. Además, las extracciones con técnicas SPE permiten su automatización. Sin embargo, como desventaja cabe destacar que los cartuchos de extracción empleados en SPE encarecen el análisis. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

1.6.1.3.5.1 Extracción:

La separación de un compuesto por extracción se basa en la transferencia selectiva del compuesto desde una mezcla sólida o líquida con otros compuestos hacia una fase líquida (normalmente un disolvente orgánico). El éxito de la técnica depende básicamente de la diferencia de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial. (Angurell et al.2019).

El principal objetivo de la extracción es separar selectivamente el producto de una reacción, o bien eliminar las impurezas que lo acompañan en la mezcla de reacción, gracias a sus diferencias de solubilidad en el disolvente de extracción elegido. (Angurell et al.2019).

- Extracción líquido-líquido (LLE)

La extracción líquido-líquido es un método muy útil para separar componentes de una mezcla. El éxito de este método depende de la diferencia de solubilidad del compuesto a extraer en dos disolventes diferentes. Cuando se agita un compuesto con dos disolventes inmiscibles, el compuesto se distribuye entre los dos disolventes. A una temperatura determinada, la relación de concentraciones del compuesto en cada disolvente es siempre constante, y esta constante es lo que se denomina coeficiente de distribución o de reparto ($K = \text{concentración en disolvente 2} / \text{concentración en disolvente 1}$). (Angurell et al.2019).

Es frecuente obtener mezclas de reacción en disolución o suspensión acuosa (bien porque la reacción se haya llevado a cabo en medio acuoso o bien porque durante el final de reacción se haya añadido una disolución acuosa sobre la mezcla de reacción inicial). En estas situaciones, la extracción del producto de reacción deseado a partir de esta mezcla acuosa se puede conseguir añadiendo un disolvente orgánico adecuado, más o menos denso que el agua, que sea

inmiscible con el agua y capaz de solubilizar la máxima cantidad de producto a extraer, pero no las impurezas que lo acompañan en la mezcla de reacción. Después de agitar la mezcla de las dos fases para aumentar la superficie de contacto entre ellas y permitir un equilibrio más rápido del producto a extraer entre las dos fases, se producirá una transferencia del producto deseado desde la fase acuosa inicial hacia la fase orgánica, en una cantidad tanto mayor cuanto mayor sea su coeficiente de reparto entre el disolvente orgánico de extracción elegido y el agua. Unos minutos después de la agitación, las dos fases se separan de nuevo, espontáneamente por decantación, debido a la diferencia de densidades entre ellas, con lo que la fase orgánica que contiene el producto deseado se podrá separar mediante una simple decantación de la fase acuosa conteniendo impurezas. La posición relativa de ambas fases depende de la relación de densidades. Dado que después de esta extracción, la fase acuosa frecuentemente aún contiene cierta cantidad del producto deseado, se suele repetir el proceso de extracción un par de veces más con disolvente orgánico puro. (Angurell et al.2019).

Una vez finalizada la operación de extracción, se tiene que recuperar el producto extraído a partir de las fases orgánicas reunidas. Para ello, se tiene que secar la fase orgánica resultante con un agente desecante, filtrar la suspensión resultante y finalmente eliminar el disolvente orgánico de la disolución seca conteniendo el producto extraído por destilación o evaporación. (Angurell et al.2019).

Aunque normalmente la extracción se utiliza para separar el producto deseado selectivamente de una mezcla, a veces lo que se pretende con la extracción es eliminar impurezas no deseadas de una disolución. (Angurell et al.2019).

- Extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE)

La Extracción en Fase Sólida sigue siendo el procedimiento de preparación de muestras de crecimiento más rápido. Es la técnica más usual en el tratamiento y concentración de muestras antes de su análisis. (Cromlab. S.L, 2006-2014).

Consta de una serie de etapas (Cromlab. S.L, 2006-2014) las cuales son:

- Etapa de Acondicionamiento: La activación del adsorbente y de los grupos funcionales se consigue al pasar un volumen de solvente o mezcla de solventes apropiado a través de la columna. Los discos fritados de la columna se solvatan convenientemente. Para activar adsorbentes hidrofóbicos se usa generalmente metanol o acetonitrilo, mientras que para los hidrofílicos se usa hexano o cloruro de metileno. Se recomienda usar de 2 a 4 volúmenes de lecho.
- Etapa de Carga de Muestra: Aplicar la muestra en la parte superior del lecho de adsorbente. Los contaminantes de matriz pueden pasar por la columna sin ser retenidos, y otros componentes de la matriz pueden

retenerse más o menos fuertemente en la superficie del adsorbente. Para obtener la máxima eficacia se debe controlar el caudal de la muestra. Si se desea incrementar el caudal de una muestra viscosa se pueden usar adsorbentes de 90 o 140 mm. La capacidad de intercambio y la selectividad no se ven afectadas (conviene analizar la fracción no retenida para comprobar que todos los compuestos de interés han sido retenidos).

- Etapa de Lavado: El lavado permite la eliminación de cualquier resto de compuestos que puedan interferir manteniendo los analitos en el lecho de adsorbente. Se pueden usar solventes o mezcla de solventes de diferente tipo para mejorar la eficacia del lavado.
- Etapa de Secado: Las trazas de solvente se eliminan haciendo circular aire a través de la columna durante 2 a 10 minutos. Esta etapa mejora el rendimiento de extracción.
- Etapa de Elución: Se pasa un solvente adecuado por la columna para eliminar la interacción analito-solvente y eluir el 100% de los compuestos de interés. El solvente adecuado ha de tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con las demás impurezas, dejándolas en el lecho de adsorbente (Los adsorbentes con partículas pequeñas de 30 a 50 mm requieren un menor volumen de elución que los adsorbentes con

partículas mayores entre 90 y 140 μm). El volumen de elución ha de ser el menor posible para mantener alto el factor de concentración

- Etapa de Concentración: Los compuestos de interés se concentran evaporando una parte del solvente. Es necesario secar el eluato con sulfato de sodio para eliminar posibles trazas de agua. La muestra concentrada ya está lista para el análisis.

1.6.1.3.6 Análisis instrumental



El análisis de pelo requiere el empleo de técnicas instrumentales que permitan determinar las sustancias de manera inequívoca, cuantificarlas con una adecuada precisión y exactitud, y con suficiente sensibilidad para alcanzar concentraciones en el rango de los picogramos por miligramo de pelo. Por ello, las dos metodologías de elección en el análisis cuantitativo de pelo son la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas y la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem. Sin embargo, es frecuente el uso de técnicas inmunoquímicas como método de barrido o *screening*. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997)

La mayoría de los métodos utilizados en el análisis del pelo emplean la espectrometría de masas como sistema de detección, ya que presenta un alto grado de sensibilidad y fiabilidad. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).

La detección se realiza mediante la relación masa/carga de los compuestos, lo que convierte a este detector en un identificador prácticamente inequívoco de las moléculas. (Lendoiro, 2016) (*Society of Hair Testing*, 1997).



1.6.1.3.6.1 Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la

fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. (Skoog et al., 2001).

En cromatografía de gases (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elusión se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte. A diferencia de la mayoría de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna (Figura 1-2). (Skoog et al., 2001).

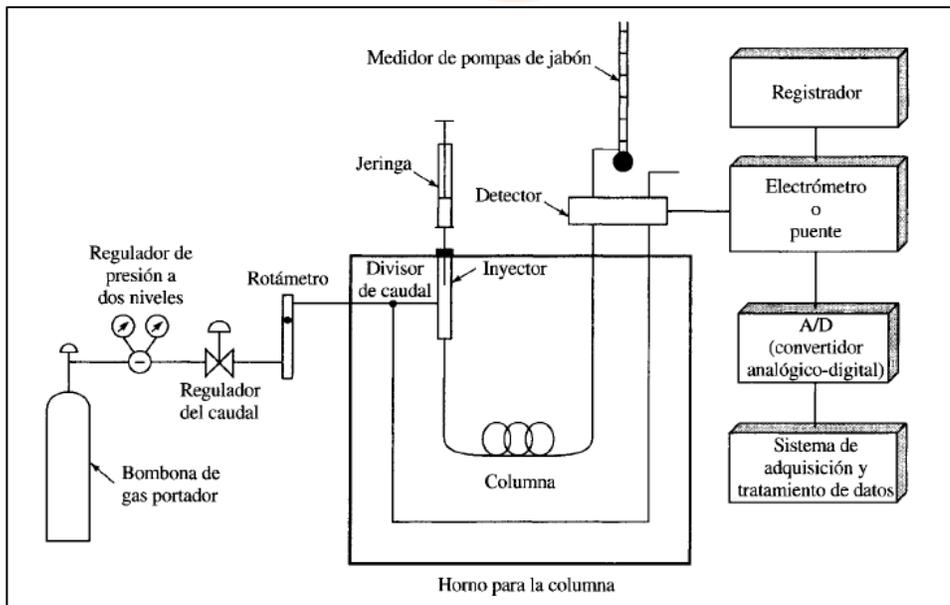
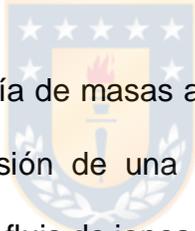


Figura 1-2: Representación esquemática de un cromatógrafo de gases. (Skoog et al., 2001)

La espectrometría de masas atómicas es una herramienta versátil y muy utilizada para identificar los elementos presentes en muestras de materia y determinar sus concentraciones. (Skoog et al., 2001).

Un espectrómetro de masas es un instrumento que separa los iones que se desplazan rápidamente según su relación masa/carga, m/z . La mayoría de los iones que se estudian presentan una sola carga, de modo que la relación es sencillamente la masa del ion. (Skoog et al., 2001).



Un análisis por espectrometría de masas atómica implica las siguientes etapas: (1) atomización, (2) conversión de una fracción significativa de los átomos formados en la etapa 1 en un flujo de iones (generalmente iones positivos de una sola carga), (3) separación de los iones formados en la segunda etapa según su relación masa/carga (m/z), donde m es la masa del ión en unidades de masa atómica y z es su carga, y (4) recuento del número de iones de cada tipo o medida de la corriente iónica producida cuando los iones formados a partir de la muestra inciden en un detector adecuado. Dado que la mayoría de los iones formados en la segunda etapa tienen una sola carga, m/z habitualmente es la masa del ión (Figura 1-3). (Skoog et al., 2001).

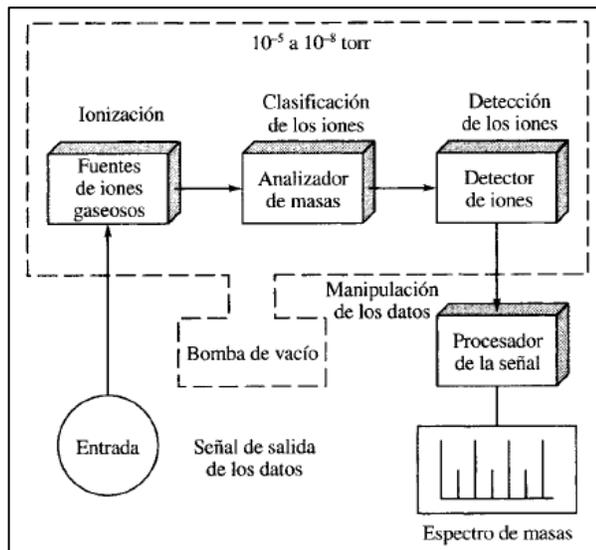


Figura 1-3: Esquema de los componentes de un espectrómetro de masas (Skoog et al., 2001)

Los fragmentos obtenidos se deben separar para ser detectados de manera individual por el detector. Para la separación de estos existen diversos analizadores, entre los cuales destaca la trampa de iones, sector o analizador magnético, tiempo de vuelo y el cuadrupolo, siendo este último el utilizado por el SML.

El detector cumplirá la labor de entregar información sobre la estructura y abundancia de los diferentes iones provenientes de los analitos en estudio mediante un informe conocido como espectro de masas. Es en este último, en donde es posible encontrar tres tipos de iones:

- Ión molecular: corresponde al ión que resulta de la pérdida de un electrón por parte de la molécula originaria y se simboliza con la letra M+.
- Ión cuantificador: corresponde al ión utilizado para el cálculo de la concentración de un analito, este podría o no entregar la señal más abundante en el espectrograma.
- Ión cualificador: corresponde a los iones acompañantes del cuantificador de un analito. Ambos se utilizan en conjunto para identificar a la molécula en el espectrograma.



Tabla 1-1: Iones cuantificadores y Cualificadores para Δ^9 -THC-TMS

Analito	Ión cuantificador	Ión cualificador
Δ^9-THC-TMS	386 (M ⁺)	371,315
Δ^9-THC-D3-TMS	389 (M ⁺)	374,318

*TMS:trimetilsilil

Respecto al análisis cuantitativo, este se realizará en base a las áreas de los picos, ya que el área de pico es independiente de los efectos de ensanchamiento debido a las variables que pueden producirse dentro de un análisis cromatográfico. Desde este punto de vista, por tanto, las áreas son un parámetro analítico más adecuado que por ejemplo un análisis basado en las alturas de pico. Además, los instrumentos cromatográficos están equipados con integradores electrónicos digitales, los cuales permiten una precisa estimación de las áreas de pico. (Skoog et al., 2001)

La relación de áreas se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Área relativa} : \text{Área muestra} / \text{Área estándar interno}$$

Ecuación 1-1: Relación de áreas

El método para el análisis cromatográfico implica la preparación de una serie de disoluciones de patrón de composición parecida a la muestra. Se obtienen los cromatogramas de los patrones y se representan las alturas o áreas de pico en función de la concentración. La representación gráfica de los datos debería originar una línea recta que pasará por el origen de coordenadas; los análisis se basan en esta gráfica. (Skoog et al., 2001).



Al utilizar este método, la fuente más importante de error en los análisis es normalmente la incertidumbre en el volumen de la muestra; a veces, la velocidad de inyección de la muestra es también un factor a considerar. A menudo, las muestras son pequeñas (~ 1 µL), y la incertidumbre asociada con la inyección de un volumen reproducible de este tamaño con una micro jeringa puede significar un cierto porcentaje relativo, tal vez de varias unidades. (Skoog et al., 2001).

Ahora bien, la mayor precisión se consigue por el uso de patrones internos debido a que se evitan las incertidumbres asociadas a la inyección de la muestra. En este procedimiento, se introduce en cada estándar y en la muestra una cantidad

exactamente medida del patrón interno, y la relación de las áreas (o alturas) del analito y del patrón interno sirve como parámetro analítico. Para poder aplicar este método satisfactoriamente, es necesario que el pico del patrón interno esté bien separado de los picos de los demás componentes de la muestra ($R_3 > 1,25$); por otra parte, el pico del patrón debería aparecer cerca del pico del analito. Con un patrón interno adecuado, se pueden conseguir, normalmente, precisiones relativas mejores que el 1 por 100. (Skoog et al., 2001).

Por otra parte, en los laboratorios forenses, es común encontrarse con moléculas inestables bajo las condiciones de trabajo, ya sea en términos de polaridad, inestabilidad térmica o volatilidad inadecuada. En ese sentido, se agregan reactivos conocidos como derivatizantes, los cuales poseen la característica de modificar las propiedades nombradas anteriormente de los analitos mediante reacciones de metilación, acilación y silanización (Santiago, 2015).

En este caso en particular el derivatizante empleado corresponde a BSTFA: TMCS (99:1) (BSTFA: N,O-bis(trimetilsilil)trifluoracetamida con 1% de trimetilclorosilano (TMCS)) el cual es un reactivo de sililación, en donde el BSTFA: R = CF₃ es un potente donante de trimetilsililo con aproximadamente la misma fuerza donante que el análogo no fluorinado, la ventaja que presenta es

que da una volatilidad más alta en sus productos de reacción (especialmente útil para GC o para algunos amino ácidos TMS de ebullición más baja).

BSTFA es no-polar y se puede mezclar con acetonitrilo para una mejor solubilidad. Para aminoácidos grasos sililantes, hidroxilos y otros compuestos difíciles de sililar (como alcoholes secundarios y aminas). (SGE, 2016).



2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Implementar una metodología analítica para la determinación de marihuana y cocaína en matriz pelo, por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Optimizar la extracción de los analitos y el análisis instrumental en la determinación de marihuana en pelo.
2. Determinar la presencia de marihuana adquirida de forma externa al pelo.
3. Combinar metodología para la extracción de cocaína en pelo en conjunto con la extracción de marihuana en pelo, utilizadas en el SML Concepción.
4. Evaluar la aplicabilidad de la metodología analítica en muestras reales.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Equipos

- Cromatógrafo de gas Agilent Thechnologies modelo 6890N
- Columna capilar Agilent: Modelo ZB-5MS 60 m x 320 μm x0,25 μm
- Inyector Agilent Technologies 7683B
- Autosampler Agilent Technologies 7683
- Detector de masas Agilent modelo 5975
- Computador con software CHEMSTATION
- Vortex Mixer LABNET
- Refrigerador Sanyo Medicoool
- Centrifuga HETTICH ROUTINA-380
- Baño termoregulado Ultronic OR JP-SELECTA
- Equipo de extracción Manifold
- Bomba de vacío iLMVAC GmbH
- Evaporador con corriente de Nitrogeno Turbo VAP® LV Caliper
- Estufa Memmert
- Agitador Multi RS-60

3.1.2 Materiales

- Micropipetas de volumen variable 2-20 μL , 20-200 μL y 100-1000 μL
- Pipetas parciales de 5 y 10 mL
- Balanza analítica AND

- Tubos de vidrio de 10 mL
- Tubos de centrifuga de 15 mL y 50 mL
- Tijeras de pelo
- Papel filtro
- Viales ámbar de 1,5 y 4 mL
- Matraz aforado de 5 mL
- Electronic crimper
- Cápsula de porcelana
- Columna de extracción en fase sólida *Bond Elut Certify*® de la marca Agilent
- Piseta
- Gradillas de tubos centrifugas y tubos eppendorf
- Guantes de látex
- Cuaderno de notas y marcadores



3.1.3 Reactivos y solventes

- Estándar certificado de (-)- Δ^9 -THC Cerilliant® de 1,0 mg/mL.
- Estándar certificado de (-)- Δ^9 -THC-D₃ Cerilliant® de 100 ug/mL
- Estándar certificado de Cocaína Cerilliant® de 10 ug/mL
- Estándar certificado de Cocaína D₃ Cerilliant® de 10 ug/mL
- Estándar certificado de Benzoilecgonina Cerilliant® de 10 ug/mL
- Estándar certificado de Benzoilecgonina D₃ Cerilliant® de 10 ug/mL
- Diclorometano grado GC marca Merck®.
- Acetato de etilo grado LC marca Merck®.
- n-Hexano grado HPLC marca Arquimed®.
- Acetonitrilo grado HPLC marca Sigma-aldrich®.

- Hidróxido de sodio pellets marca Merck®.
- Gas nitrógeno
- Ácido clorhídrico
- Buffer fosfato
- Metanol
- Ácido acético
- Acetona
- Cloroformo
- Isopropanol
- Amoniaco
- Derivatizante BSTFA: TMCS 99:1

3.1.4 Otros

- Pelo de voluntarios
- Papel blanco



3.2 METODOLOGÍA

Para llevar a cabo los fundamentos del seminario se emplearon técnicas extractivas basadas en: las recomendaciones que hace la *Society of Hair Testing* (SoHT), (presentadas en la sección 1.6 Análisis en matriz pelo); un protocolo de trabajo perteneciente al Sr. Álvaro Ignacio Chávez Rodríguez, de su memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico, denominado: “ANALISIS DE MARIHUANA EN MATRIZ PELO POR CROMATOGRFIA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS”, (protocolo de uso exclusivo del Servicio Médico Legal Concepción, ANEXO 1); y las recomendaciones que propone la normativa chilena: “GUÍA TÉCNICA TOXICOLOGÍA Y ANÁLISIS DE CANNABIS Y SUS DERIVADOS” (Figueroa et al. Capítulo 2, 2015) para la identificación en la matriz pelo para los analitos THC-COOH en muy bajas concentraciones. Dicha normativa propone: Primero una preparación de la muestra, en donde se realiza un paso de descontaminación en que se puede utilizar solventes orgánicos: tomando 100 mg de muestra, luego se lava con 5 mL de diclorometano por 2 minutos, posteriormente se deja secar en un papel adsorbente y se vuelve a repetir el lavado. (Figueroa et al. Capítulo 2, 2015). Luego la extracción de la muestra, en donde el primer paso es la homogenización de la muestra, lo que se consigue cortando el pelo en segmentos de 1 a 3 mm. Para ello se recomienda obtener por lo menos 20-30 mg de pelo del individuo ya lavado. Es posible realizar la extracción con metanol, soluciones ácidas o buffer

en el que para este paso es 0,01-0,50 M HCl o bien 1M de buffer fosfato a pH 6,4-7,6 y dejar la solución a 56°C por toda la noche. Luego se realiza un proceso de digestión utilizando 1M de NaOH que se añade al pelo, dejando la solución por 1 hora a 80°C y 60°C por toda la noche. Finalmente, la extracción en fase sólida se realiza utilizando un cartucho de adsorbente apolar C8. (Figuroa et al. Capítulo 2, 2015).

Además, se tuvo en consideración las propiedades fisicoquímicas del Δ^9 -THC presentadas en la Tabla 3-1



Tabla 3-1. Propiedades fisicoquímicas del Δ^9 -THC (UNODC, 2010)

Fórmula empírica	$C_{21}H_{30}O_2$
Peso molecular	314,46 g/mol
pKa	10,6
Log P	6,99 (octanol/agua)
Solubilidad	Agua: insoluble (2,8 mg/L 23°C) Etanol: soluble Cloroformo: soluble Hexano: soluble

Ahora bien en relación a la implementación de una metodología analítica para la determinación de Cocaína y Marihuana en conjunto en matriz pelo, se procedió según los objetivos planteados, en primer lugar se optimizó el análisis instrumental y la extracción de analitos en la determinación de marihuana en pelo,

una vez establecidos ambos puntos se evaluó la descontaminación que se le realiza a la matriz antes de ser sometida a la extracción, ajustando el lavado. Una vez obtenido cabellos libres de contaminación externa (evaluado en base a las áreas obtenidas y a la presencia o ausencia del Δ^9 -THC) se procedió a combinar las metodologías para la extracción de cocaína y marihuana en pelo, y se culminó en realizar un análisis de muestras reales para evaluar la aplicabilidad de ambas metodologías.

3.2.1 Consideraciones generales

3.2.1.1 Preparación de soluciones patrón o estándar

A modo general, se prepararon una serie de diluciones en metanol las cuales fueron usadas a lo largo de toda la experiencia, a partir de los Estándares Cerilliant® Δ^9 -THC (concentración 1,0 mg/mL) y Δ^9 -THC-D₃ (concentración 100 µg/ mL), obteniéndose diluciones de concentración conocida siendo para:

- Δ^9 -THC: 100 ng/µL; 10 ng/µL y 1 ng/µL
- Δ^9 -THC-D₃: 10 ng/µL

3.2.1.2 Tipos, Recolección y almacenamiento de las muestras de cabello

Las muestras de cabello que se emplearon durante la experiencia, se clasificaron en 2 grupos:

1. Cabello libre de los analitos en estudio, denominado desde ahora en adelante como “Pelo blanco”, cabello perteneciente a una persona no consumidora de Marihuana, ni Cocaína, y que no ha estado expuesta a una contaminación pasiva de lo mismo. Además, el cabello se sometió en primera instancia a una descontaminación para eliminar algún residuos de productos cosméticos así como del ambiente, por medio de lavados con Diclorometano tal como lo indica el procedimiento de análisis para cabello, adjunto en el anexo 1; una vez cumplido el objetivo 2 la descontaminación pasó a ser una serie de solventes (agua→acetona→metanol→diclorometano)
2. Cabellos positivos, los cuales presentan los analitos en estudio.

La toma de muestra se realizó con tijeras desde el área occipital de la cabeza con un grosor similar a un lápiz de pasta BIC®. Las muestras fueron almacenadas dentro de sobres de papel a temperatura ambiente durante todo el periodo previo al análisis.

3.2.2 Metodología para el Objetivo N°1

Para dar cumplimiento al objetivo N°1 referido a *Optimizar la extracción de los analitos y el análisis instrumental en la determinación de marihuana en pelo*; este se basó en 2 puntos clave:

1. Volumen y Tipo de inyección
2. Extracción mediante columnas *Bond Elut Certify*®

3.2.2.1 Volumen y tipo de inyección

En la metodología diseñada para la determinación de marihuana en pelo se consideraron los siguientes parámetros tal como muestra la Tabla 3-2

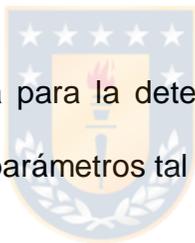


Tabla 3-2: Condiciones Cromatográficas de la metodología previamente desarrollada

Parámetro	Condiciones
Modo de inyección	PTV
Volumen de inyección	10 µL
Temperatura inyector	Temperatura en gradiente: inicial de 50°C por 1,60 min 700°C/min hasta 330°C por 20 min.
Gas carrier	Helio 6.0
Flujo columna	1,8 mL/min
Horno	Temperatura en gradiente: inicial de 100°C por 4,50 min 40°C/min hasta 270 °C por 1 min 10°C/min hasta 315°C por 5,75 min

PTV: modo de inyección a Temperatura Programada; min: minutos

Ahora bien para optimizar el análisis se procedió a cambiar la inyección de 10 μL en forma PTV, a 2 μL en forma Splitless, modo que consiste en una inyección sin división diseñada particularmente para análisis de trazas en muestras altamente diluidas como lo es en este caso, además el solvente usado y la temperatura de horno inicial son dos parámetros críticos para producir el llamado Efecto Solvente que permite concentrar los componentes, especialmente más volátiles, en bandas iniciales muy estrechas. (Cromlab S.L, 2015). Además, el volumen de inyección de 2 μL seleccionado, se basa principalmente en que inyecciones pequeñas de alrededor de 1 μL presentan incertidumbre asociada con la inyección de un volumen reproducible de este tamaño con una micro jeringa pudiendo significar un cierto porcentaje relativo, tal vez de varias unidades (Skoog et al., 2001) aunque esto se resuelve con el uso de patrones internos obteniéndose una mayor precisión y se evitan las incertidumbres asociadas a la inyección de la muestra (Skoog et al., 2001), se decidió inyectar 2 μL en vez de 1 μL .

Para poder comprobar que el cambio en el sistema de inyección es aplicable y da mejores resultados, se sobrecargaron 4 tubos de vidrio con 4 concentraciones nominales diferentes de solo Δ^9 - THC, las que eran 0,05 ng/mg, 0,1 ng/mg, 0,5 ng/mg y 2,0 ng/mg de pelo, pero sin matriz pelo, los cuales se sometieron a todo el proceso extractivo tal como lo señala el anexo 1. En el anexo 6 se detallan

todos los cálculos realizados, luego cada extracto se inyectó en el equipo en las 2 formas planteadas anteriormente, 10 μL en inyección PTV y 2 μL en inyección Splitless. No se agregó estándar interno ya que solo se quiso analizar presencia o ausencia del analito en cuestión, además de al no ir acompañado de la matriz pelo, los resultados que se observaron fueron indiscutiblemente atribuibles a la sobrecarga y no a algún interferente de la muestra.

A su vez, se prepararon 4 tubos de vidrio con 3 concentraciones nominales diferentes de Δ^9 - THC, las que fueron 0,05 ng/mg, 0,1 ng/mg, y 0,5 ng/mg pero se añadió la cantidad de 100 mg de pelo a cada uno de los tubos, además de la cantidad necesaria para la concentración de 2 ng/mg de estándar interno Δ^9 - THC- D_3 para 100 mg de pelo a cada uno de los tubos, como se ve en la Tabla 3-3: Volumen de estándares adicionados a cada tubo, esto luego se sometió a todo el proceso extractivo pero esta vez solo se inyectó en el modo Splitless la cantidad de 2 μL . Lo anterior se realizó por triplicado teniendo en total 4 puntos para analizar.

En ambos casos se eligió la concentración de 0,05 ng/mg como la menor ya que corresponde al límite de detección por parte del instrumento, concentración encontrada en los registros para la metodología de análisis en Marihuana en pelo, además de ser el nivel de corte (*cut-off*) planteado por la *SoHT*; las otras dos

concentraciones se seleccionaron por encontrarse en un rango relativamente bajo y que puede ser crítico al momento de discriminar entre una muestra positiva de una negativa.

El análisis se realizó bajo una relación de áreas expresada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Área relativa} : \text{Área muestra} / \text{Área estándar interno}$$

Ecuación 3-1: Relación de áreas

El cambio en la inyección se evaluó cualitativamente, según la información que nos otorgaban los cromatogramas, junto con el análisis de las relaciones de áreas.

Tabla 3-3: Volumen de estándares adicionados a cada tubo

Analito	Δ^9 -THC			Δ^9 -THC-D ₃		
	Concentración Nominal (ng/mg)	Concentración del Estándar Cerilliant® (ng/μL)	Volumen a tomar (μL)	Concentración Nominal (ng/mg)	Concentración del Estándar Cerilliant® (ng/μL)	Volumen a tomar (μL)
Tubo 1	0,05	1	5			
Tubo 2	0,1	1	10	2	10	20
Tubo 3	0,5	1	50			

Con los datos obtenidos anteriormente se realizaron algunas estimaciones en relación a parámetros de validación, para tener una aproximación de cómo se

comporta el método de análisis, siguiendo las recomendaciones de la *Food and Drug Administration* (FDA) [Guía del año 2018]. Hay que aclarar desde ya que este no fue un trabajo de validación, por ende no se realizaron los suficientes ensayos ni se midieron los suficientes parámetros de validación, aun así se calcularon los siguientes parámetros:

- Linealidad: se determinó mediante una curva de calibración de siete puntos para Δ^9 -THC, dependiendo de las condiciones de cada caso como se detalla en la sección 3.2.6 Curvas de Calibración. Luego se graficó el promedio de la relación de áreas entre el analito y su estándar interno, los iones utilizados fueron el 386(M⁺) y 389(M⁺) respectivamente. Se calculó la ecuación de la recta y su respectivo coeficiente de determinación (r^2).
- Precisión: se determinó mediante la replicabilidad y la precisión intermedia.

Replicabilidad: se analizaron tres niveles de concentración con tres repeticiones independientes entre ellos según las recomendaciones generales por parte de la FDA, en este caso las concentraciones fueron de 0,05 ng/mg; 0,1 ng/mg y 0,5 ng/mg de pelo para Δ^9 -THC. Como resultado se calculó la concentración real de cada nivel con su respectivo

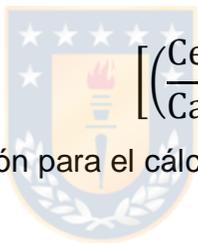
coeficiente de variación (CV), la finalidad de este último es concluir si es que existieron variaciones significativas entre ellos.

Precisión intermedia: las recomendaciones generales por parte de la FDA son tener al menos 3 niveles de concentración con 3 puntos como mínimo independientes entre ellos, y analizados en 2 días diferentes. Como se dijo al inicio la finalidad de estos cálculos fueron solo referenciales, por consecuencia el número de inyecciones que se realizó en días diferentes solo se aplicó a dos niveles de concentración nominal, 0,05 y 0,1 ng/mg de pelo para Δ^9 -THC, por ser la concentración de 0,05 ng/mg el límite de detección por parte del instrumento, y 0,1 ng/mg por encontrarse en un rango relativamente bajo y que puede ser crítico al momento de discriminar entre una muestra positiva de una negativa. Se realizaron cálculos de la concentración experimental obtenida para cada nivel, y se calculó su correspondiente coeficiente de variación promedio entre ambos días.

Para aceptar que el método es preciso su Coeficiente de Variación debe ser menor o igual al 15% ($CV \leq 15\%$), si son superiores se habla de variación significativa y por lo tanto no hay precisión en el método. (FDA, 2018).

- Exactitud: las recomendaciones generales por parte de la FDA son tener al menos 3 niveles de concentración con 3 puntos como mínimo independientes entre ellos. La exactitud se evaluó por medio del porcentaje de recuperación y del porcentaje de error de tres niveles, una vez más las concentraciones nominales fueron 0,05, 0,1 y 0,5 ng/mg de pelo para Δ^9 -THC. Como resultado se calculó el porcentaje de recuperación y de error mediante las siguientes fórmulas:

Porcentaje recuperación


$$\left[\left(\frac{C_e}{C_a} \right) \times 100 \right]$$

Ecuación 3-2: Ecuación para el cálculo del Porcentaje de Recuperación

Siendo:

Ce = Concentración obtenida del analito en la muestra en ng/mg.

Ca = Concentración del analito adicionado a la muestra en ng/mg.

Porcentaje error

$$\left[\left(\frac{V_r - V_o}{V_r} \right) \times 100 \right]$$

Ecuación 3-3: Ecuación para el cálculo del Porcentaje de error

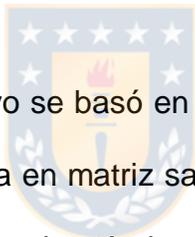
Siendo:

Vr = Valor de referencia

Vo = Valor obtenido

Los criterios de aceptación para determinar exactitud en las muestras según la FDA, deben ser para el Porcentaje de recuperación $\pm 15\%$ del valor nominal, esto quiere decir que la concentración real debe ser entre un 85-115 % de la concentración nominal con un porcentaje de error menor o igual al 15%.

3.2.2.2 Extracción mediante columnas *Bond Elut Certify*®



La siguiente parte del objetivo se basó en el procedimiento normado de trabajo para el análisis de Marihuana en matriz sangre del SML (anexo 3), para ello se cargaron 6 tubos de vidrio con el estándar Δ^9 -THC, 3 tubos a una concentración nominal de 0,05 ng/mg (Forma A) y los otros 3 tubos a 0,5 ng/mg (Forma B), junto con 100 mg de pelo blanco y 20 μ L del estándar interno Δ^9 -THC-D₃ de concentración 10 μ g/ μ L correspondiente a 2 ng/mg. Además de 3 tubos Blanco los que solo constaron del estándar interno y matriz pelo.

Como se señaló al inicio los ensayos se basaron en el protocolo de análisis de marihuana en sangre. En dicho procedimiento una vez que la muestra de sangre es tratada, se extrae el sobrenadante y se deposita en un tubo limpio para luego agregar una solución de Ácido Acético 100 mM (Anexo 3. Línea 11); esta parte

se homologó a lo que se realiza en el tratamiento del pelo y una vez finalizada la incubación (Anexo 1, línea N° 20) se agregó uno de los siguientes ácidos:

- Ácido acético 1M
- Ácido fosfórico 50 mM
- Ácido clorhídrico 1M

La cantidad de ácido que se agregó a cada tubo, correspondió al volumen suficiente para alcanzar el pH 1 del ácido fosfórico 50 mM, ya que es esta solución la que se emplea para activar la columna de extracción *Bond Elut Certify®*, ya que la interacción que ocurre entre el analito y la columna es iónica y debe tener la misma afinidad por el medio ácido es que se prueban estos 3 ácidos (ácido acético, ácido fosfórico y ácido clorhídrico) y por lo tanto una vez alcanzado el pH se continua con el procedimiento que está establecido en el procedimiento para el análisis de marihuana en sangre (Anexo 3. Línea N°12 en adelante).

Finalizado el procedimiento y una vez derivatizados los extractos según lo indicado en el mismo protocolo, estos son inyectados en el equipo, y fueron analizados en primer lugar si había presencia o ausencia del analito Δ^9 -THC, luego, las muestras que dieron presencia se analizaron según su relación de áreas.

3.2.3 Metodología para el Objetivo N° 2

Respecto al objetivo número 2: *Determinar la presencia de marihuana adquirida de forma externa al pelo*, y la importancia de éste se basa en que según bibliografía (Lendoiro, 2016) (Jurado, 2012) (*Society of Hair Testing*, 1997) una forma de ingreso de analitos al pelo es exógenamente, además de que si no se realiza una adecuada descontaminación externa, se puede correr el riesgo de tener falsos positivos, si lo llevamos al trabajo realizado esto se podría deber a una exposición pasiva al humo de marihuana, por lo tanto para dar cumplimiento al objetivo planteado este se subdividió en 3 partes.



3.2.3.1 Primera parte: Contaminación externa del cabello y lavados según protocolo del SML Concepción

Se comenzó con una contaminación externa de pelos blancos con humo de marihuana, los cuales fueron nombrados según la naturaleza del cabello siendo:

S1: Cabello del sujeto N°1: pelo teñido, pero no decolorado

S2: Cabello del sujeto N° 2: pelo teñido y decolorado

S3: Cabello del sujeto N° 3: pelo natural sin tratamiento cosmético

Se tomó una muestra de cabello según las indicaciones que realiza la *SoHT*, las cuales son: toma de muestra de la zona occipital, un mechón del diámetro de un lápiz, si no se quiere dejar una zona muy expuesta, se puede realizar la toma de varios mechones de menor diámetro en diferentes zonas aledañas; por cada sujeto se tomaron 2 muestras las cuales fueron depositadas en 2 tubos cónicos de 50 mL, y rotulados según qué tipo de muestra era, por ejemplo:

S1.1= Sujeto 1, tubo 1

S1.2= Sujeto 1, tubo 2



Una vez se tuvieron los tubos rotulados, un individuo libre y voluntariamente accedió a fumar Marihuana y exhalar el humo sobre los cabellos blancos, dándole las siguientes indicaciones:

“Frente a Ud. Tiene 6 tubos, que contienen en su interior pelo, se le solicita que una vez que realice sus actividades recreacionales destape cada uno de los tubos y deposite en ellos el humo que exhale por cada inhalación que realice.

Debe prestar atención a que una vez depositado el humo en el interior del tubo, cierre inmediatamente este, evitando así que se pueda escapar el contenido.

Desde ya muchas gracias por su cooperación”

Una vez recolectados nuevamente los tubos y teniendo claro conocimiento del día en que fueron contaminados, se dejó por 7 días el pelo en contacto con el humo, esta cantidad de días fue determinada ya que se querían conseguir

concentraciones altas, para probar la efectividad de los lavados, una vez cumplidos los días, bajo campana de extracción se abrió el tubo, y el cabello contenido se traspasó con pinzas a un nuevo tubo limpio. Siguiendo con información bibliográfica (Duvivier et al. 2016) se procedió a tomar una muestra de aproximadamente 100 mg de cabello por cada tubo, se llevó a polvo y se depositó en un tubo de vidrio limpio, libre de Δ^9 - THC, pero cargado con 20 μ L Δ^9 - THC-D₃ de 10 ng/ μ L y sin realizar ningún lavado al pelo se hizo todo el proceso extractivo para determinar si existía la presencia de Δ^9 - THC, en los cabellos contaminados, acompañada la extracción de un blanco y un control positivo, el cual para el análisis de Marihuana en pelo es de 2 ng/mg de pelo.



Cumplido lo anterior y comprobando que existía Δ^9 - THC en las muestras se comenzó con una seguidilla de lavados, los que son parte del protocolo de lavado para el análisis de marihuana en pelo del Servicio Médico Legal Concepción (Anexo 1) que consistió en:

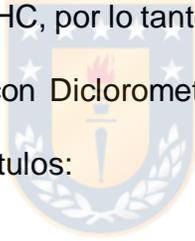
1. Masar aproximadamente 120 a 130 mg de las muestras de cabello contaminadas de los respectivos contenedores y depositarlo en tubos de centrifuga de 15 mL previamente rotulados.
2. Comenzar el lavado agregando 8 mL de Agua destilada.

3. Agitar durante 1 min en vortex, luego agitar durante 10 min en Agitador Multi RS-60 y por último centrifugar por 1 min a 4500 revoluciones por minuto (r.p.m).
4. Eliminar el remante de agua.
5. Luego con pinzas traspasar el pelo a una cápsula de porcelana previamente rotulada.
6. Secar el pelo en estufa a una temperatura entre 80 – 85 °C por aproximadamente 40 min.
7. Una vez cumplido el tiempo sacar el pelo de la estufa y con pinzas volver a traspasarlo a nuevos tubos de centrifuga previamente rotulados.
8. Agregar 8 mL de Diclorometano.
9. Agitar en vortex por 1 min, luego 10 min en agitador Multi RS-60 y Centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m.
10. Eliminar el remanente de diclorometano cuidando de no perder pelo en este paso.
11. Repetir desde el punto 8 al 10, dos veces más.

Para realizar un análisis de como el Diclorometano elimina el Δ^9 - THC exógeno, cada una de las eliminaciones que se realizan en el punto 10 son recolectadas en frascos de vidrio ámbar de 4 mL, que contienen evaporado a sequedad la cantidad de 2 ng/ml del estándar interno Δ^9 - THC-D₃; luego los viales ámbar que

contenían el diclorometano fueron llevados a evaporar, una vez secos fueron sometidos al proceso de derivatización para finalmente ser inyectados en el equipo, y analizados en función de la relación de áreas.

La cantidad total de lavados con Diclorometano que se realizaron fueron 6, 3 veces más que las señaladas en el protocolo para el análisis de marihuana en pelo del Servicio Médico Legal Concepción (Anexo 1), ya que los resultados obtenidos del análisis de los residuos de Diclorometano, de los 3 primeros, mostraron presencia de Δ^9 -THC, por lo tanto se realizó un nuevo ciclo de lavados (este consta de 3 lavados con Diclorometano). Cada uno de los extractos se guardó bajo los siguientes rótulos:



N° del lavado, Identificación de la muestra

Por ejemplo: **1 S1.1** = Lavado 1 del pelo del Sujeto 1 del tubo 1.

3.2.3.2 Segunda parte: Elección de nuevos solventes para el Lavado

Debido a los resultados que se obtuvieron en la primera parte se decidió a realizar una búsqueda bibliográfica de solventes que fueran empleados en la descontaminación del pelo, idealmente de muestras que tuvieran presencia de

residuos de marihuana, fue así como se llegó a plantear un nuevo lavado siguiendo modelos ya propuestos en bibliografía por Vogliardi et al. (2015) en su *review* y por Duvivier et al. (2016) en su experiencia, de ambos autores y considerando que la SoHT recomienda que un buen lavado debe ser tanto por solventes acuosos y orgánicos, no por separados o solamente aplicando un tipo de solvente, se llegó a la conclusión de realizar el siguiente orden de lavado, el cual consistió en:

1. Agregar 4 mL de Agua destilada.
2. Agitar 1 min en vortex, luego 10 min en agitador Multi RS-60, luego centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m.
3. Eliminar el remanente de agua.
4. Agregar 4 mL de Acetona.
5. Agitar 1 min en vortex, luego 10 min en agitador Multi RS-60, luego centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m.
6. Eliminar el remanente de Acetona.
7. Agregar 4 mL de Metanol.
8. Agitar 1 min en vortex, luego 10 min en agitador Multi RS-60, luego centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m.
9. Eliminar el remanente de Metanol.
10. Agregar 4 mL de Diclorometano.

11. Agitar 1 min en vortex, luego 10 min en agitador Multi RS-60, luego centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m.
12. Eliminar el remanente de Diclorometano.

Este lavado fue probado en 3 de las muestras de cabello que quedaban, S1.2, S2.1 y S2.2, ya que las demás muestras se agotaron en la primera experiencia, y al igual que en los lavados de diclorometano, cada remanente a excepción del agua, fueron puesto en viales ámbar, que contenían solo el estándar interno Δ^9 -THC-D₃, los que luego fueron evaporados, derivatizados e inyectados en el equipo, para analizar.



Tras los resultados obtenidos del análisis, se observó la presencia de Δ^9 -THC, y por lo tanto se decidió hacer 2 veces más el lavado planteado, pero desde el Punto 4: *Agregar 4 mL de Acetona...* en adelante, guardando por cada eliminación el remanente, bajo rótulos según el modelo experimental.

3.2.3.3 Tercera parte: Pruebas de contaminación externa y variaciones del lavado

Luego del análisis de las dos experiencias anteriores se decidió plantear un nuevo plan de trabajo, el cual consideró dos aristas, la primera enfocada en la contaminación externa de la matriz pelo con humo de marihuana y la segunda en desarrollar un lavado adecuado modificando algunos parámetros.

3.2.3.3.1 Contaminación externa del pelo



Respecto a este punto se trató de reducir al mínimo las variables para dicha contaminación, esto quiere decir que se le indicó al individuo libre y voluntario, que debía de echar el humo a todos los tubos idealmente el mismo día, en un lapsus no tan grande de tiempo entre un tubo y otro, además debía de ser la misma marihuana para todos los tubos, y que por cada tubo inhalara la misma cantidad de tiempo (por ejemplo 2 segundos) y eso mismo exhalarlo dentro del tubo, otro detalle que se sumó es que un cigarrillo suele contener entre 0,5 y 1 gramo de cannabis, cuyo contenido en THC dependerá del preparado. En función del número de inhalaciones y de su intensidad la cantidad de THC que suministra el “porro” varía entre el 20% y el 70% de su contenido. (Oliveró. 2000), por lo mismo se sugirió el uso de una pipa, nueva, sin residuos y de uso exclusivo para

la experiencia, ya que en esta no influye la confección manual, pudiendo distribuir para todas las inhalaciones la misma cantidad de marihuana.

A la vez se quiso evaluar la influencia del tiempo de contacto entre el humo de marihuana y el pelo, y en como las concentraciones que se encontraron pudiesen influir al momento del lavado y la eliminación de la contaminación externa, para eso, se cargó una cantidad semejante a 650 mg de cabello blanco por cada tubo y se dejaron en humo por 12 horas, 3,5 días y 7 días. Los tiempos asignados se basaron en replicar la primera experiencia en donde el pelo se dejó por 7 días en humo de marihuana, se planteó este tiempo como el pelo con mayor concentración, luego se redujo a la mitad, de ahí surge que unas muestras permanezcan 3,5 días y se definió un tiempo mínimo de contacto de 12 horas, si bien en bibliografía (Duvivier et al. (2016)) se planteó una metodología en la cual el cabello fue sometido durante 30 minutos, esto no es replicable en las condiciones en que se realizó este trabajo. Una vez cumplidos los tiempos asignados, cada pelo se traspasó a un tubo de centrifuga de 50 mL limpio y se almacenó en un lugar fresco y protegido de la luz solar directa. Además, para evitar que falte muestra por cada tiempo se contaminaron 3 tubos.

A medida que se cumplió el tiempo designado a cada tubo, y traspasada la matriz contaminada a un tubo limpio y claramente rotulado, se tomó una muestra de 100

mg, la cual se sometió a todo el proceso de extracción para saber si este quedó con residuos de THC.

3.2.3.3.2: Variaciones en los lavados del pelo

En paralelo y considerando las experiencias 3.2.3.1 y 3.2.3.2, el principio de la teoría del reparto y en información bibliográfica (Duvivier et al. (2016)), se decidió realizar variaciones al Lavado del protocolo de análisis de marihuana en pelo (anexo 1), así como al Lavado planteado en la segunda experiencia, desarrollando lo que se muestra en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4: Detalles de las variaciones a probar en los diversos lavados

Tipo de lavado	Lavado Tipo 1	Lavado Tipo 2	Lavado Tipo 3
Detalles			
Solvente 1	4 mL Agua destilada	4 mL Agua destilada	4 mL Agua destilada
Tiempo en agitador vortex	1 min	2 min	2 min
Tiempo en agitador multi RS-60	10 min	20 min	20 min

Centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m y eliminar el remanente

Continua

Tabla 3-4: Detalles de las variaciones a probar en los diversos lavados

Tipo de lavado	Lavado Tipo 1	Lavado Tipo 2	Lavado Tipo 3
Detalles			
Repetir el lavado con el Solvente 1	1 vez	1 vez	2 veces consecutivas
Llevar a la Estufa a 80°C por 40 min			
Solvente 2	4 mL de Diclorometano	4 mL de Diclorometano	4 mL de Acetona
Tiempo en agitador vortex	1 min	2 min	2 min
Tiempo en agitador multi RS-60	10 min	20 min	20 min
Centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m y eliminar el remanente			
Repetir el lavado con el Solvente 2	6 veces consecutivas	6 veces consecutivas	2 veces Consecutivas
Solvente 3			4 mL de Metanol
Tiempo en agitador vortex			2 min
Tiempo en agitador multi RS-60			20 min

Continua

Tabla 3-4: Detalles de las variaciones a probar en los diversos lavados

Tipo de lavado	Lavado Tipo 1	Lavado Tipo 2	Lavado Tipo 3
Detalles			Centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m y eliminar el remanente
Repetir el lavado con el Solvente 3			2 veces Consecutivas
Solvente 4			4 mL de Diclorometano
Tiempo en agitador vortex			2 min
Tiempo en agitador multi RS-60			20 min
			Centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m y eliminar el remanente
Repetir el lavado con el Solvente 4			2 veces Consecutivas

Teniendo claro las variaciones a los Lavados, se procedió a realizar la descontaminación de la matriz pelo. Para ello por cada contenedor de muestras contaminadas según los tiempos designados (12 horas, 3,5 días o 7 días), se tomaron 3 muestras de cabello de 110 mg cada una aproximadamente, que se depositaron en 3 tubos diferentes y se sometió a los 3 tipos de lavados según lo descrito en la Tabla 3-4; además cada uno de los remanentes por solvente fueron guardados (excepto el remanente de Agua destilada, este fue desechado) en viales ámbar que contenían el estándar interno Δ^9 -THC-D₃, todo debidamente rotulados según el diseño experimental planteado.



Ahora bien, una vez analizado cada uno de los lavados, y de asegurarse que estos se encontraban bajo los límites detectables por el equipo para el Δ^9 -THC, se procedió a realizar una extracción según los procedimientos generales para Análisis de Marihuana en pelo, para descartar algún ingreso del analito en la matriz, o en su defecto que el lavado es efectivo y arrastra todo lo contaminado externamente.

3.2.3.3.2.1 Pruebas adicionales para el Lavado Tipo 3

Tras el análisis se decidió optimizar el lavado Tipo 3, para ello se decidió emplear el tubo 2 con pelo en humo por 3,5 días, ya que se encuentra al medio de algo que este muy contaminando a poco contaminado. Se procedió en primer lugar a tomar una muestra de aproximadamente 100 mg para extraerla según el análisis de Marihuana en pelo, luego se masaron 4 muestras más de 100 mg de cabello cada una del mismo tubo 2, las que se depositaron en 4 tubos de centrifuga de 15 mL limpios y se realizaron los lavados según las variaciones que se detallan en la Tabla 3-5 en comparación a la forma original del Lavado tipo 3.



Tabla 3-5: Variaciones aplicadas al Lavado Tipo 3 en comparación a la forma original del Lavado (Forma D)

Forma Detalles	A	B	C	D (original)
Solvente 1	4 mL Agua destilada			
Tiempo en agitador vortex	2 min	2 min	2 min	2 min
Tiempo en agitador multi RS-60	20 min	15 min	10 min	20 min

Centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m y eliminar el remanente

Continua

Tabla 3-5: Variaciones aplicadas al Lavado Tipo 3 en comparación a la forma original del Lavado (Forma D)

Forma Detalles	A	B	C	D (original)
Repetir el lavado con el Solvente 1	1 vez	2 veces consecutivas	2 veces Consecutivas	2 veces Consecutivas
Solvente 2	4 mL de Acetona	4 mL de Acetona	4 mL de Acetona	4 mL de Acetona
Tiempo en agitador vortex	2 min	2 min	2 min	2 min
Tiempo en agitador multi RS-60	20 min	15 min	10 min	20 min
Centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m y eliminar el remanente				
Repetir el lavado con el Solvente 2	1 vez	2 veces Consecutivas	2 veces Consecutivas	2 veces Consecutivas
Solvente 3	4 mL de Metanol	4 mL de Metanol	4 mL de Metanol	4 mL de Metanol
Tiempo en agitador vortex	2 min	2 min	2 min	2 min
Tiempo en agitador multi RS-60	20 min	15 min	10 min	20 min
Centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m y eliminar el remanente				
Repetir el lavado con el Solvente 3	1 vez	2 veces Consecutivas	2 veces Consecutivas	2 veces Consecutivas

Continua

Tabla 3-5: Variaciones aplicadas al Lavado Tipo 3 en comparación a la forma original del Lavado (Forma D)

Forma	A	B	C	D (original)
Detalles				
Solvente 4	4 mL de Diclorometano			
Tiempo en agitador vortex	2 min	2 min	2 min	2 min
Tiempo en agitador multi RS-60	20 min	15 min	10 min	20 min
Centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m y eliminar el remanente				
Repetir el lavado con el Solvente 4	1 vez	2 veces Consecutivas	2 veces Consecutivas	2 veces Consecutivas

Se resalta cada celda que ha sido modificada en relación a la Forma D

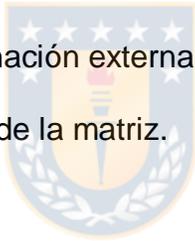
Al igual que en toda la experiencia cada uno de los remanentes por solvente fueron guardados (excepto el remanente de Agua destilada, este fue desechado) en viales ámbar que contenían el estándar interno Δ^9 -THC-D₃, debidamente rotulados según si son Lavados Tipo 3 A, B, C o D.

Luego cada uno de los lavados se analizó considerando que las muestras se encontrarán bajo los límites detectables por el equipo para el Δ^9 -THC, y así se determinó cual Forma de lavado era más efectiva.

3.2.4 Metodología para el Objetivo N°3

Para el desarrollo del Objetivo N°3: *Combinar metodología para la extracción de cocaína en pelo en conjunto con la extracción de marihuana en pelo, utilizadas en el SML Concepción*, se debió tener en claro que, de forma genérica, los pasos necesarios para el análisis toxicológico del pelo son:

1. Recogida de la muestra y almacenamiento.
2. Segmentación del mechón.
3. Eliminación de la contaminación externa.
4. Extracción de los analitos de la matriz.
5. Procesos de purificación.
6. Análisis instrumental. (Society of Hair Testing, 1997)



Dentro de esto lo que se hizo fue igualar la etapa de “*Eliminación de contaminación externa*”, haciéndola una para ambos procedimientos, si bien el análisis de cocaína en matriz pelo (Anexo 2) hace referencia al uso de diclorometano como solvente de lavado, en las averiguaciones realizada para el análisis de marihuana en matriz pelo, los solventes que se seleccionaron son utilizados en la búsqueda de ambos analitos (Vogliardi et al. 2015), y por lo tanto no deberían afectar a la matriz pelo, para evitar cualquier posible influencia se puso a prueba si dicho lavado influyó o no, en muestras reales; pero para el

desarrollo de este objetivo se trabajó con pelo blanco descontaminado con el Lavado Tipo 3 que consiste en una serie de solventes (Agua, Acetona, Metanol y Diclorometano).

Por otro lado, en el análisis de cocaína en matriz pelo en la *Etapa de extracción* del analito hay una subetapa que corresponde a la digestión del pelo y tras la cual queda un sobrenadante y un residuo, son estos residuos con los que se trabajó y los que se sometieron a la etapa de extracción pero ahora en la determinación de marihuana en pelo, para ello se sobrecargaron 2 tubos de centrifuga de 15 mL con:

Tubo 1: - 15 ng/mg de Cocaína - 15 ng/mg de Cocaína-D₃
- 5 ng/mg de Δ^9 -THC - 2 ng/mg de Δ^9 -THC-D₃
- 100 mg de pelo

Tubo 2: - 15 ng/mg de Cocaína - 15 ng/mg de Cocaína-D₃
- 5 ng/mg de Δ^9 -THC - 2 ng/mg de Δ^9 -THC-D₃

Los 2 tubos fueron sometidos a ambos análisis, primero al de cocaína y luego al de Marihuana según los anexos 2 y 1, una vez obtenidos los resultados estos se analizaron según la relación de áreas expresada mediante la siguiente ecuación:

Área relativa : Área muestra/Área estándar interno

Ecuación 3-4: Relación de áreas

Se prepararon además 4 tubos de centrifuga más 1 tubo de vidrio con concentraciones creciente de cocaína y Δ^9 -THC. Siendo:

- 0,05 ng/mg Δ^9 -THC + 0,5 ng/mg Cocaína
- 0,5 ng/mg Δ^9 -THC + 1,0 ng/mg Cocaína
- 1,0 ng/mg Δ^9 -THC + 5,0 ng/mg Cocaína (Esta concentración se aplicó al tubo de vidrio)
- 5,0 ng/mg Δ^9 -THC + 15 ng/mg Cocaína

Cada tubo se sobrecargó además con los estándares internos Δ^9 -THC-D₃ y Cocaína-D₃ y 100 mg de cabello blanco.

Todo lo anterior acompañado de un 5° tubo denominado Blanco, el que solo contiene los estándares internos antes mencionados más los 100 mg de pelo blanco. Los 6 tubos se sometieron a ambos análisis y se evaluaron los resultados en función de la relación de áreas.

Debido a lo obtenido con ambas experiencias se decidió probar un rango de concentración bajo de Δ^9 -THC, en donde se seleccionaron 5 puntos: 0,05 ng/mg, 0,08 ng/mg, 0,1 ng/mg, 0,3 ng/mg y 0,5 ng/mg; como lo que se quería probar era como afectaba el método en conjunto de extracción de Cocaína y Marihuana al Δ^9 -THC, los tubos solo se cargaron con el estándar de Δ^9 -THC, el estándar interno Δ^9 -THC-D₃ y 100 mg de cabello blanco, más un tubo blanco solo con el estándar interno Δ^9 -THC-D₃ y 100 mg de cabello blanco.

Además como el Análisis de Marihuana en pelo se realiza en tubos de vidrio, se decidió probar las concentraciones de 0,05 ng/mg y 0,08 ng/mg de Δ^9 -THC junto el estándar interno Δ^9 -THC-D₃ y 100 mg de cabello blanco, en tubos de vidrio limpios para comparar con los resultados obtenidos de los tubos de centrifuga de polipropileno.

3.2.5 Metodología para el Objetivo N°4

Respecto al Objetivo N°4: *Evaluar la aplicabilidad de la metodología analítica en muestras reales*, se pusieron a prueba los resultados obtenidos en los anteriores objetivos, empleándolos en muestras reales.

Para comenzar se obtuvieron 3 muestras de cabello, de 3 individuos diferentes que solo fueran consumidores ocasionales de Marihuana, dicha matriz se dividió en dos, una parte fue analizada sin lavar y la otra se sometió al Lavado Tipo 3, en donde se recolectó el último remanente de solvente, el cual se inyectó en el equipo para analizarlo, una vez lavado el cabello se realizó todo el proceso de análisis de Marihuana en pelo.

Por otro lado, se realizó una búsqueda en el servicio médico legal de las muestras que habían llegado durante el año 2019 para ser periciadas para la identificación de Cocaína en matriz pelo, de dicha investigación se seleccionaron 20 muestras que fueron peritadas, informadas y en disposición de ser eliminadas, puesto que cumplían con el tiempo designado. Además de presentar evidencia en las fichas de tomas de muestras, de ser posibles consumidores de Marihuana, o que venían asociadas a una muestra de Orina, que haya arrojado ser positiva para THC.

Una vez recolectadas las muestras, se buscó (en aquellos cabellos que se podía, y que estaba claramente identificado el inicio [Cabello proximal] y el fin [Cabello distal]) el último corte que se le realizó a la muestra (cabe recordar que como son muestras periciadas, estas ya presentan un corte de 3 cm desde la base de toma de muestra) y desde ahí se midieron aproximadamente 3 cm, se cortó y se pesó una cantidad semejante a 200 mg de pelo, para tener homogeneidad en las

muestras puesto que por cada una se realizarán dos análisis pero la matriz debe ser sometida a la misma descontaminación; una vez pesado estos 200mg de cabello se depositaron en tubos de centrifuga de 15 mL limpios, claramente rotulados.

Se procedió a realizar la descontaminación del pelo por medio del Lavado Tipo 3 Forma D. Una vez cumplido con el lavado, el pelo dentro del tubo fue secado bajo una corriente de nitrógeno, una vez seco, se tomó con pinzas y se depositó dentro de un papel enrollado en forma cónica para poder cortarlo, llevándolo a una forma de polvo. Realizado esto se volvió a pesar y se dividió 2 papelillos de 100 mg cada uno y se comenzó a analizar.

La primeras 20 muestras fueron analizadas solo por el Método de Análisis de Marihuana en pelo, mientras que la segunda, fue analizada por el Método de Cocaína y Marihuana en conjunto, como en dicho análisis para el caso del Análisis de Cocaína en pelo solo se altera la etapa de Eliminación de la contaminación del pelo, los extractos de Cocaína fueron procesados, para analizar si el lavado afectaba o no a los resultados, y estos nuevos resultados comparados con los que se encontraban en los archivos del SML. Por último, todos los extractos fueron analizados bajo una relación de áreas.

Como dato extra al realizar estas extracciones se sumó un nuevo analito, para el análisis de Cocaína en pelo, Benzoilecgonina-D₃ de 10 ug/mL; ya que su forma sin deuterar es uno de los metabolitos activos de la Cocaína y varias de las muestras peritadas la presentaban. Dicho estándar interno fue agregado a cada tubo previamente, junto con los demás empleados (Cocaína-D₃ y Δ^9 -THC-D₃), se suma un tubo blanco, más un control positivo con todos los analitos anteriormente señalados más Benzoilecgonina de 10 μ g/mL.

3.2.6 Curvas de Calibración



Para poder evaluar todos los datos recolectados se realizaron 3 curvas de calibración con 6 puntos como mínimo, y cada punto por triplicado, que fueron sometidos a los diferentes métodos dependiendo de para que iba enfocada cada curva, así surgieron:

- **Curva para Lavados:** para realizar esta curva solo se cargaron estándares de Δ^9 -THC y Δ^9 -THC-D₃, en viales ámbar, en cantidad suficiente para 100 μ L, volumen final en el cual se recuperan todos los analitos; esta curva no fue sometida a ningún método extractivo, solo se derivatizó e inyectó al equipo.

Los puntos a considerar fueron 0,05 ng/μL, 0,08 ng/μL, 0,1 ng/μL, 0,5 ng/μL, 1,0 ng/μL, 2,5 ng/ μL 5,0 ng/μL.

- **Curva para Δ^9 -THC por Método de Análisis de Marihuana en pelo:** para realizar esta curva solo se cargaron estándares de Δ^9 -THC y Δ^9 -THC-D₃, en tubos de centrifuga de 15 mL, en cantidad suficiente para 100 mg de pelo; luego fue sometida a todo el método de extracción para Marihuana en pelo, los extractos se derivatizaron e inyectaron al equipo.

Los puntos a considerar fueron 0,05 ng/mg, 0,08 ng/mg, 0,1 ng/mg, 0,5 ng/mg, 1,0 ng/mg, 5,0 ng/mg y 15 ng/mg.

- **Curva para Concentraciones bajas de Δ^9 -THC por Método de Análisis de Marihuana en pelo*:** para realizar esta curva solo se cargaron estándares de Δ^9 -THC y Δ^9 -THC-D₃, en tubos de vidrio de 10 mL, en cantidad suficiente para 100 mg de pelo; luego fue sometida a todo el método de extracción para Marihuana en pelo, los extractos se derivatizaron e inyectaron al equipo.

Los puntos a considerar fueron 0,05 ng/mg, 0,08 ng/mg, 0,1 ng/mg, y 0,25 ng/mg;

*Estos puntos son la excepción a las demás curvas en que solo se hicieron por duplicado y se tomaron 4 puntos.

- **Curva para Δ^9 -THC por método en Conjunto de Análisis de Cocaína y Marihuana en pelo:** para realizar esta curva solo se cargaron estándares de Δ^9 -THC y Δ^9 -THC-D₃, en tubos de centrifuga de 15 mL, en cantidad suficiente para 100 mg de pelo; luego fueron sometidos a todo el método de extracción para Cocaína y Marihuana en conjunto en matriz pelo, los extractos se derivatizaron e inyectaron al equipo.

Los puntos a considerar fueron 0,05 ng/mg, 0,08 ng/mg, 0,1 ng/mg, 0,3 ng/mg, 0,5 ng/mg, 1,0 ng/mg, 5,0 ng/mg y 10 ng/mg



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis del cabello ha demostrado un gran potencial en la detección y el control del uso de drogas. La concentración de Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) que se puede detectar en el cabello después del uso de un fármaco activo es generalmente mucho menor que 5 μg de THC / g de cabello. Por eso en el análisis del cabello para identificar el consumo de cannabis a menudo se restringe a la identificación de THC, ya que las concentraciones de 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -THC, que se reportan como 0,1 μg / g de cabello, no se pueden determinar mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC / MS). En consecuencia, para los cannabinoides, el uso de la proporción de fármaco metabolito a fármaco, propuesta para diferenciar el uso activo de la exposición pasiva, no se puede aplicar a los casos de rutina. (Thorspecken et al., 2004), sumado a la importancia de aplicar un método de descontaminación externa del pelo, porque si bien se han demostrado cantidades detectables de THC en la sangre de los no fumadores después de la exposición al humo de marihuana, las bajas concentraciones en la sangre en estas circunstancias hacen que sea poco probable que las cantidades de THC en el cabello sean medibles, pero la deposición de un medicamento sobre la matriz de queratina del cabello desde el medio ambiente se ha propuesto como una fuente adicional de hallazgos farmacológicos en el cabello. (Thorspecken et al., 2004).

Considerando lo anterior solo se consideró la búsqueda del Δ^9 -THC, puesto que por motivos instrumentales la determinación del 11-nor-THC-COOH, no es posible por encontrarse su concentración en pelo alrededor de los pg/mg, y el equipo no es lo suficientemente sensible para detectar ese orden de concentraciones, entendiendo como sensibilidad a la cantidad mínima de sustancia detectable en un ensayo.

Entonces para el análisis de los metabolitos de THC como los demás se debieron tener claros los iones específicos, los que se presentan en la Tabla 4-1: Iones Cualificadores para los metabolitos en estudio.



Tabla 4-1: Iones Cualificadores para los metabolitos en estudio

Metabolito	Iones Cualificadores (m/z)				
Δ^9 -THC-TMS	386	371	315	303	73
Δ^9 -THC-D ₃ -TMS	389	374	346	315	306
Cocaína-TMS	182	82	303		
Cocaína-D₃-TMS	185	85	306		
BZG-TMS	240	82	361		
BZG-D₃-TMS	243	85	364		

*Se destacan los iones que se utilizaron para cuantificar
TMS: agente derivatizante trimetilsilil; BZG: Benzoilgonina

4.1 Resultados y discusión para el Objetivo N°1

4.1.1 Volumen y Tipo de inyección

En la Tabla 4-2 se presenta una comparación entre las condiciones cromatográficas usadas en el protocolo de Análisis de Marihuana en pelo y las condiciones nuevas con las cuales se desarrolló este objetivo.

Tabla 4-2: Comparación de las Condiciones Cromatográficas empleadas para la metodología desarrollada

Parámetro	Condiciones previas de inyección	Condiciones nuevas de inyección
Modo de inyección	PTV	Splitless
Volumen de inyección	10 µL	2µL
Temperatura inyector	Temperatura en gradiente: inicial de 50°C por 1,60 min 700°C/min hasta 330°C por 20 min.	Temperatura en gradiente: inicial de 50°C por 1,60 min 700°C/min hasta 330°C por 20 min.
Gas carrier	Helio 6.0	Helio 6.0
Flujo columna	1,8 mL/min	1,8 mL/min
Horno	Temperatura en gradiente: inicial de 100°C por 4,50 min 40°C/min hasta 270 °C por 1 min 10°C/min hasta 315°C por 5,75 min	Temperatura en gradiente: inicial de 100°C por 4,50 min 40°C/min hasta 270 °C por 1 min 10°C/min hasta 315°C por 5,75 min

PTV: modo de inyección a Temperatura Programada; min: minutos

Se inyectaron 4 muestras en ambos modos PTV y Splitless obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 4-3; en donde solo se cargó el analito Δ^9 -THC, sin estándar interno ya que se quería poner a prueba si el analito era recuperado o no, y si su cromatograma estaba bien definido y cual diferente era uno de otro.

Tabla 4-3: Área obtenida para el ion 386 de Δ^9 -THC-TMS por la metodología de análisis de Marihuana en pelo, sin matriz pelo, inyectadas en ambos modos de inyección PTV y Splitless

Modo de Inyección Concentración Nominal (ng/mg)	Modo PTV	Modo Splitless
	Área del Ion 386	
0,05	1162704	317305
0,1	1525794	423186
0,5	7598044	1861155
2	28427858	7928509

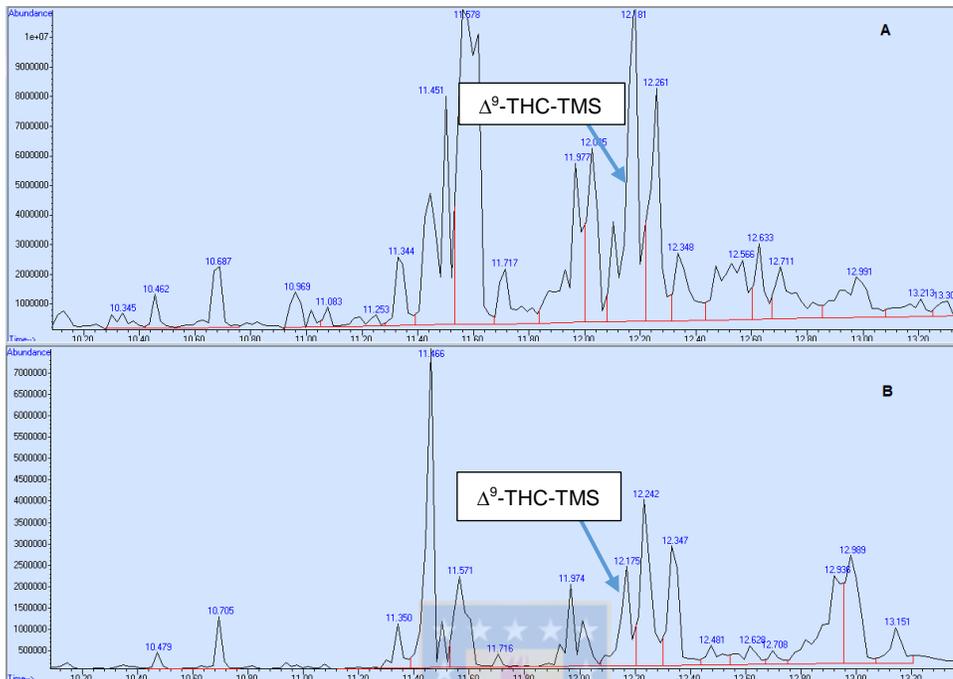


Figura 4-1: Comparación de los Cromatograma para la Concentración nominal de 0,5 ng/mg de pelo de Δ^9 -THC-TMS, inyectadas por modo PTV (A) y modo Splitless (B) [tiempo de retención: 12,16 minutos]

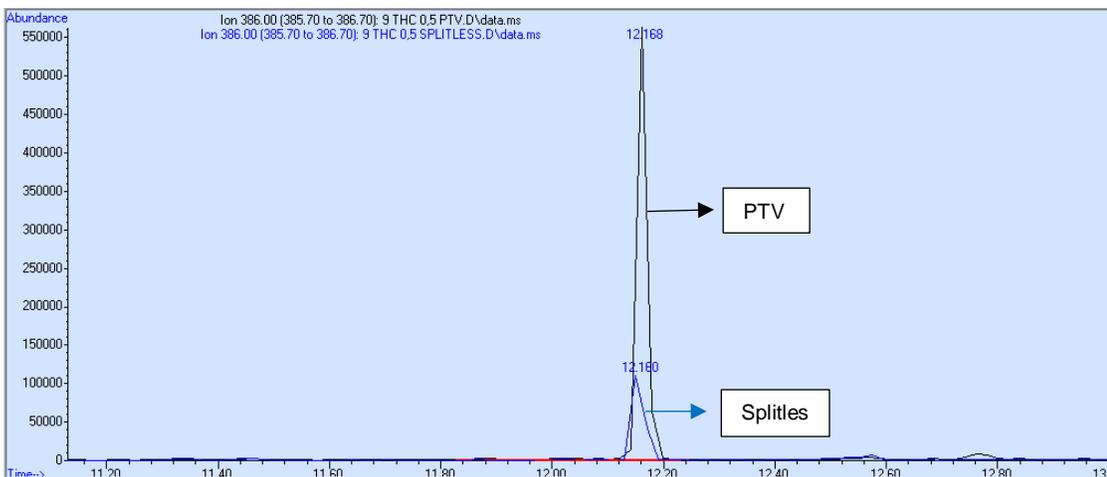


Figura 4-2: Comparación de la fragmentación de la Concentración nominal de 0,5 ng/mg de pelo de Δ^9 -THC-TMS, para el ion 386, inyectadas por modo PTV (línea negra) y modo Splitless (línea azul) [tiempo de retención: 12,16 minutos]

Si bien, las áreas por modo PTV son aproximadamente un 73% más que las del modo Splitless (Figura 4-2), hay que dejar claro que se inyecta un volumen 5 veces más en el modo PTV, y producto de este mayor volumen, es que se recupera más analito, pero los cromatogramas presentan mayores señales ruido (Figura 4-1), porque el modo PTV, lo que hace es concentrar mediante la eliminación de solvente, por lo mismo ingresa una mayor cantidad de analito, muy útil en muestras que presentan trazas, ahora si llevamos esto al análisis de pelo, este presenta muchos residuos provenientes de la matriz pelo que hacen que el liner y en especial la fuente de iones se ensucie más, y por lo mismo se deba realizar una limpieza del equipo mucho más frecuente, permitiendo solo el ingreso de un par de muestras, mientras que las ventajas que nos ofrece la inyección en modo Splitless es que nos permite de igual forma analizar trazas pero con la salvedad que la fuente de iones y el liner se ensucia menos permitiendo optimizar el trabajo y la cantidad de muestras a analizar en una sola corrida, ya que se inyecta menos cantidad de muestra y por lo tanto los residuos que queden de la inyección son menos, hay que agregar que si bien el liner ayuda como filtro es para partículas o residuos de mayor tamaño, los más pequeños pasan a través del sistema cromatográfico y llegan a la fuente ensuciándola, pero al ser menos volumen de inyección, menos son los residuos y por lo tanto mayor son el número de muestras que se analizarán por corrida.

Producto de lo anterior se prepararon 3 tubos con concentraciones nominales diferentes, pero con matriz pelo, las cuales solo se inyectaron en modo Splitless obteniéndose los resultados que muestra la Tabla 4-4, en donde se aprecia una buena recuperación de los analitos y en los cromatogramas estos son claramente identificados principalmente la concentración nominal de 0,05 ng/mg de pelo (Figura 4-3), que es el límite de detección por parte del equipo. Para mayor detalle se decidió realizar cada inyección por triplicado, obteniéndose los resultados de la Tabla 4-5; pero estos resultaron mal definidos específicamente para el punto más bajo de concentración nominal 0,05 ng/mg (Figura 4-4); importante debido a que esta concentración permite discrepar entre una muestra negativa de una positiva, por eso se volvió a replicar la experiencia, lo que quedó registrado en la Tabla 4-6.

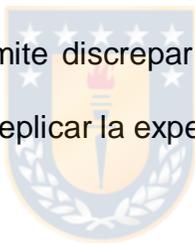


Tabla 4-4: Áreas obtenida para el ion 386 y 389 correspondientes a Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS respectivamente, por la metodología de análisis de Marihuana en pelo, con matriz pelo e inyectadas en modo Splitless

Concentración Nominal (ng/mg)	Área del ion 386 perteneciente a Δ^9-THC-TMS	Área del ion 389 perteneciente a Δ^9-THC-D₃-TMS	Relación de áreas
0,05	247452	3662410	0,06756535
0,1	358848	3365163	0,10663614
0,5	1302087	3773877	0,34502635

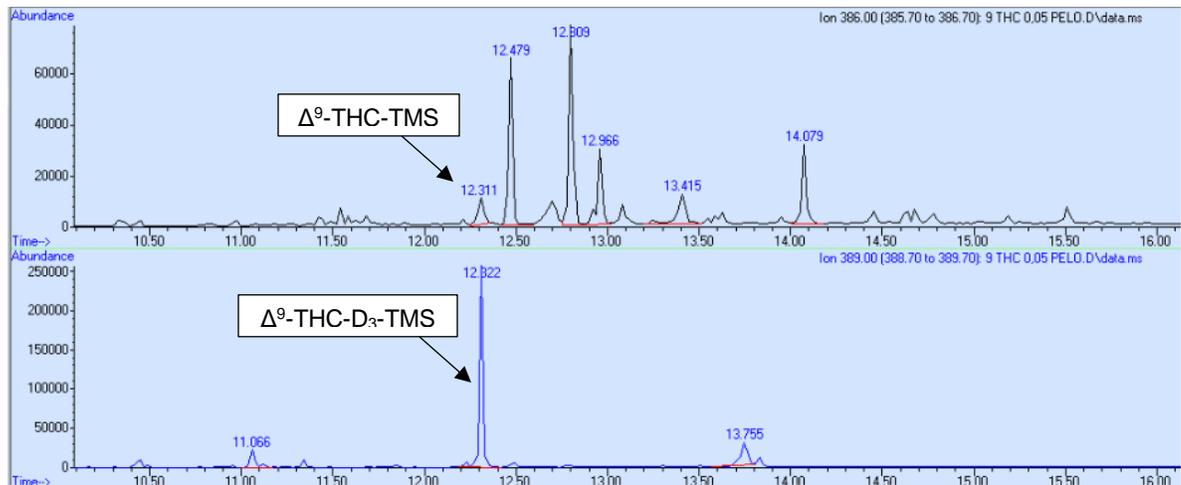


Figura 4-3: Cromatograma del ion 386 y 389 correspondientes a la Concentración nominal 0,05 ng/mg de pelo para Δ^9 -THC-TMS, y 2 ng/mg de Δ^9 -THC-D₃-TMS (Estándar interno), inyectadas por modo Splitless [tiempo de retención: 12,31 minutos]

Tabla 4-5: Promedio de la relación de áreas más desviación estándar obtenida para los oines 386 y 389 correspondientes a Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS respectivamente, por la metodología de análisis de Marihuana en pelo, con matriz pelo e inyectadas en modo Splitless por triplicado

Concentración Nominal (ng/mg)	Promedio de la relación de áreas \pm Desviación estándar
0,05	0,0492 \pm 0,0132
0,1	0,0692 \pm 0,0200
0,5	0,3130 \pm 0,0265

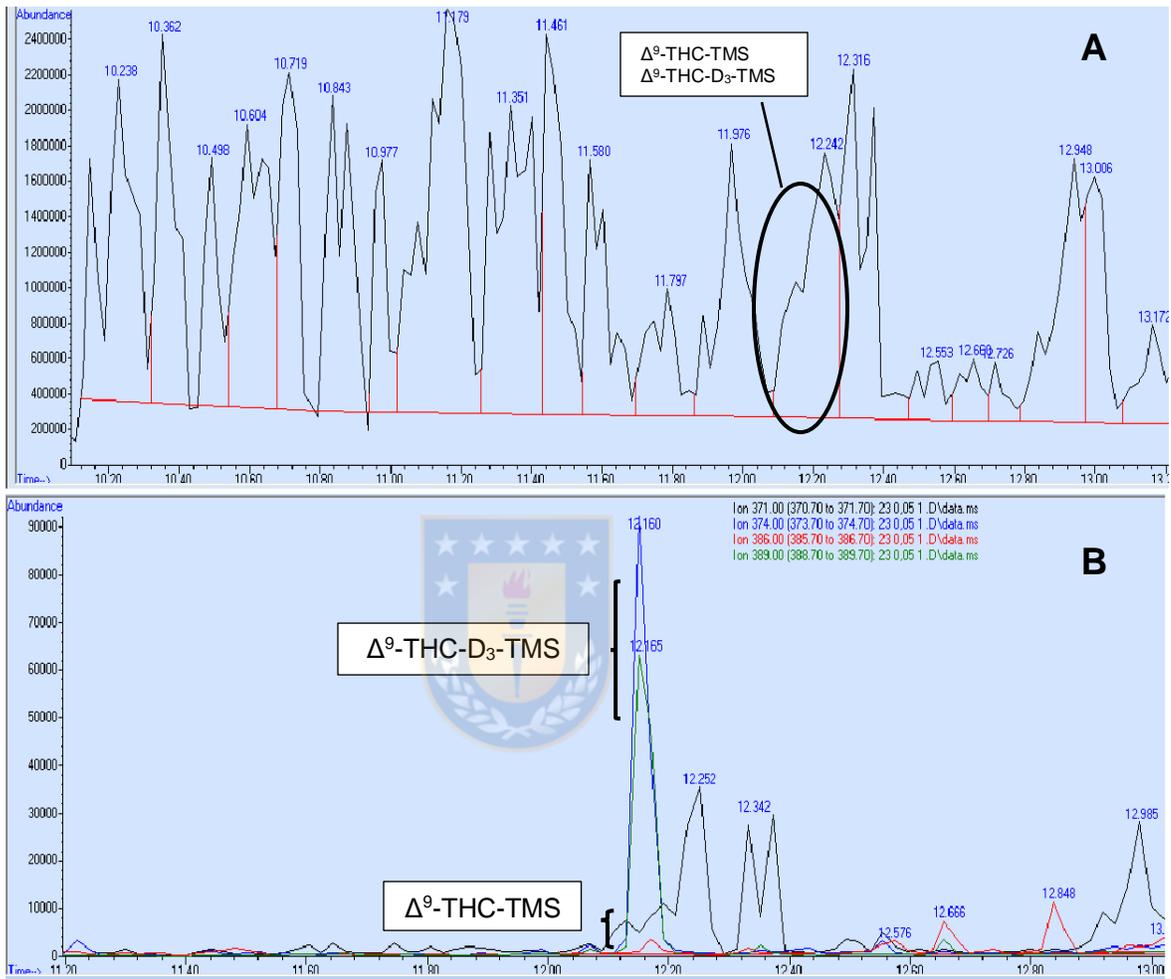


Figura 4-4: Cromatograma (A) de la muestra del Tubo 1 de concentración nominal 0,05 ng/mg de pelo para Δ^9 -THC-TMS, y 2 ng/mg de Δ^9 -THC-D₃-TMS (Estándar interno), en donde se puede apreciar que hay una gran cantidad de interferentes en la muestra; en la parte B se aprecia la Fragmentación de los iones correspondientes a Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS y se puede apreciar que la abundancia de los iones 371 y 386 pertenecientes a Δ^9 -THC-TMS son muy bajas [inyección: Splitless, tiempo de retención: 12.16 minutos]

Tabla 4-6: Promedio de la relación de áreas obtenida para el ion 386 y 389 correspondientes a Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS respectivamente, por la metodología de análisis de Marihuana en pelo, con matriz pelo e inyectadas en modo Splitless por triplicado en una segunda ocasión.

Concentración Nominal (ng/mg)	Promedio de la Relación de áreas Δ^9-THC/Δ^9-THC-D₃ ± Desviación estándar
0,05	0,0276 ± 0,0078
0,1	0,0619 ± 0,0036

Con lo anterior se decidió realizar algunos cálculos matemáticos de precisión y exactitud, para ello en primer lugar se evaluó la linealidad realizándose una curva de calibración, donde se midieron 7 puntos por triplicado, el material empleado para realizarlo fueron tubos de centrifuga de 15 mL, los resultados se expresan en la Tabla 4-7 y en el Gráfico 4-1, en ella se observa un buen grado de linealidad con un coeficiente de determinación de $r^2= 0,9202$ siendo éste cercano a la unidad, lo que sugiere que existe relación entre las relaciones de áreas del analito y su relación de concentración, al graficar todos los puntos, pero si se analiza la zona baja de esta, la pendiente cambia a negativa, como se muestra la Gráfica 4-2: Parte baja de la Curva de calibración para Δ^9 -THC, realizada en tubos de centrifuga por la metodología de análisis de Marihuana en pelo, con un coeficiente de determinación de $r^2= 0,3897$ algo muy alejado de la unidad, es por esto que se realiza una nueva curva de calibración, pero solo para los puntos

bajos, donde se cargaron solo 4 puntos por ser los más críticos, la salvedad es que esta se realiza en tubos de vidrios, los resultados se presentan en la Tabla 4-8, y en el Gráfico 4-3, en este se puede apreciar que hay linealidad, que en comparación con la anterior curva esta es una pendiente positiva con un coeficiente de determinación de $r^2=0.9267$; como los puntos por triplicado se realizaron en tubos de vidrio, y corresponden a la zona baja se decide emplear esta curva para realizar los cálculos matemáticos para identificar precisión y exactitud, cabe señalar que si los puntos son interpolados en la curva de calibración hecha en tubos de centrifuga, los cálculos de concentración son muy sobreestimados, en cambio en la curva de zona baja, las concentraciones caben dentro de los rangos esperados, la explicación a esto se basa principalmente en la afinidad que presenta el Δ^9 -THC con los tubos de plástico en comparación con los tubos de vidrio puesto que el THC puede interactuar con el material plástico no polar a través de interacciones no covalentes y adsorber a las superficies de contenedores de plástico (Molnar, 2013). Debido a la poca cantidad de tubos de vidrio, a la fatiga del material, y a posibles residuos que podrían quedar de los lavados producto de la reutilización de los mismo, es que se decidió cambiar a los tubos de centrifuga de polipropileno, los cuales se encuentran nuevos, y son desechados posteriormente al análisis, pero se rescata mucho menos Δ^9 -THC, y las relaciones de áreas son distintas, es por eso que cada parte dependiendo de si se trabajó en vidrio o en plástico, se analizó con su respectiva curva.

Tabla 4-7 Curva de calibración: Resultados obtenidos del promedio la relación de áreas junto con su desviación estándar y concentración nominal de metodología analítica “Análisis de Marihuana en pelo” realizada en tubos de centrifuga para Δ^9 -THC-TMS para estudio de linealidad.

[C] nominal de Δ^9 -THC-TMS (ng/mg)	Promedio de la Relación de áreas* \pm desviación estándar
0,05	0,0432 \pm 0,0105
0,08	0,0352 \pm 0,0139
0,1	0,0231 \pm 0,0113
0,5	0,1467 \pm 0,0413
1,0	0,2864 \pm 0,0489
5,0	1,3435 \pm 0,1312
15,0	4,059 \pm 1,5776

*La relación de áreas es entre el área del estándar y el área del estándar interno deuterado.

[C]=Concentración

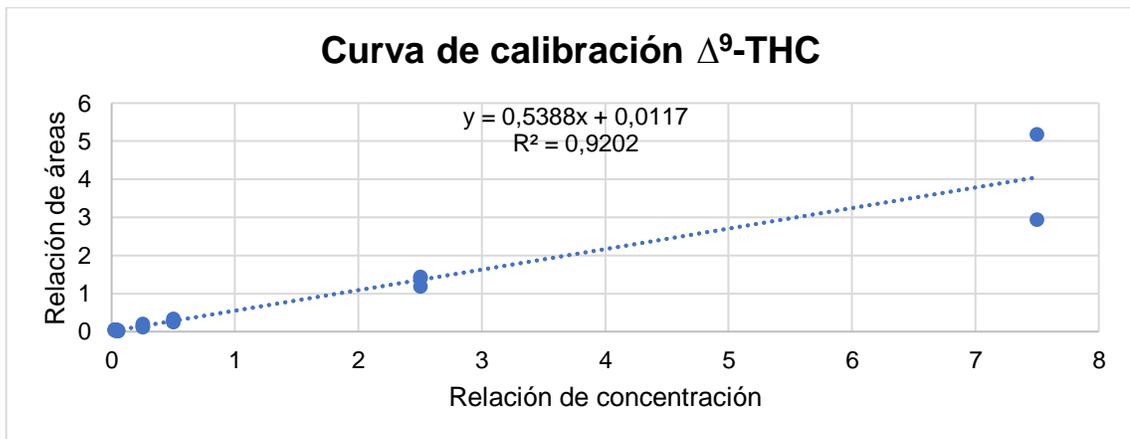


Gráfico 4-1: Curva de calibración para Δ^9 -THC, realizada en tubos de centrifuga por la metodología de análisis de Marihuana en pelo.

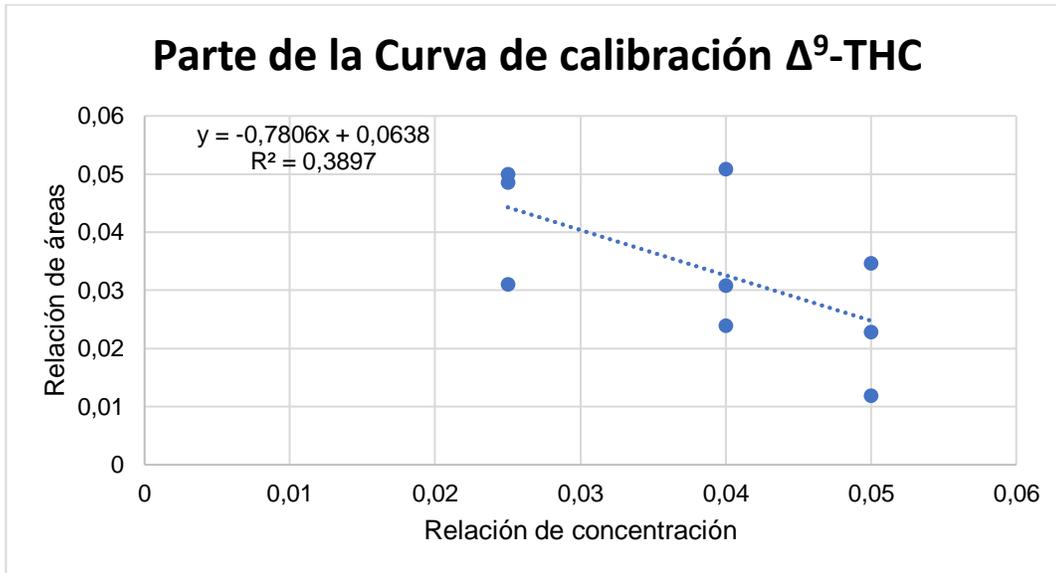


Gráfico 4-2: Parte baja de la Curva de calibración para Δ^9 -THC, realizada en tubos de centrifuga por la metodología de análisis de Marihuana en pelo.

Tabla 4-8: Curva de calibración para concentraciones bajas: Resultados obtenidos de la relación de áreas, promedio de estas y concentración nominal de metodología analítica “Análisis de Marihuana en pelo” realizada en tubos de vidrio para Δ^9 -THC-TMS para estudio de linealidad.

[C] nominal de Δ^9-THC-TMS (ng/mg)	Promedio de las Relación de áreas* \pm Desviación estándar
0,05	0,0220 \pm 0,0047
0,08	0,0467 \pm 0,0199
0,1	0,0581 \pm 0,0012
0,25	0,1260 \pm 0,0186

*La relación de áreas es entre el área del estándar y el área del estándar interno deuterado. [C]= Concentración

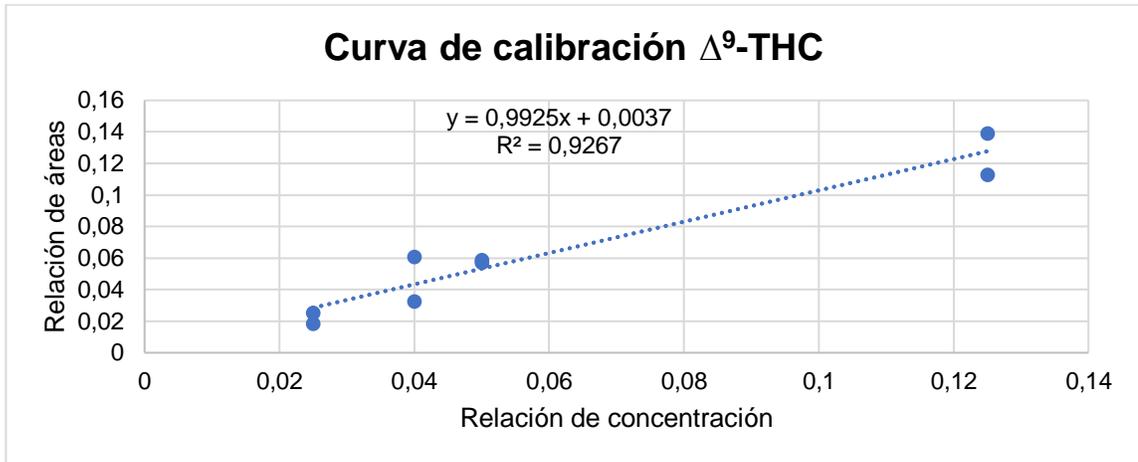


Gráfico 4-3: Curva de calibración para bajas concentraciones de Δ^9 -THC, realizada en tubos de vidrio por la metodología de análisis de Marihuana en pelo.

Para los cálculos de precisión se analizaron dos parámetros de validación: replicabilidad y precisión intermedia, en cada caso se calculó el coeficiente de variación, resultados se presentan en las Tablas 4-9 y 4-10; para medir la exactitud se calculó el porcentaje de recuperación y el porcentaje de error, resultados en la Tabla 4-11.

Tabla 4-9: Resultados para evaluar replicabilidad para Δ^9 -THC-TMS

[C] nominal ng/mg	Promedio [C] obtenida (ng/mg) ± Desviación estándar	CV (%)
0,05	0,048 ± 0,0157	32,70
0,1	0,117 ± 0,0073	6,22
0,5	0,623 ± 0,0534	8,57

[C]= Concentración

CV= Coeficiente de variación

Tabla 4-10: Resultados para evaluar precisión intermedia para Δ^9 -THC-TMS

[C] nominal (ng/mg)	Día	Promedio [C] obtenido (ng/mg) \pm Desviación estándar	CV (%)	Promedio de CV (%)
0,05	1	0,091 \pm 0,0266	28,99	30,85
	2	0,048 \pm 0,0157	32,70	
0,1	1	0,132 \pm 0,0403	30,53	18,38
	2	0,117 \pm 0,0073	6,223	

[C]= Concentración

CV= Coeficiente de Variación

Respecto a los parámetros evaluados para indicar que el método es preciso, la concentración nominal de 0,05 ng/mg no presenta precisión en el método (CV \leq 15%) [FDA.2018]; las concentraciones nominal 0,1 ng/mg y 0,5 ng/mg presentaron una buena replicabilidad (CV \leq 15%); sin embargo la precisión intermedia de la concentración nominal 0,1 ng/mg es de un 18,38%, no cumpliendo con los criterios de aceptación, en el caso de la concentración nominal de 0,5 ng/mg su precisión intermedia no se calculó, esto debido a como se dijo al inicio la finalidad de estos cálculos fueron solo referenciales, por consecuencia el número de inyecciones que se realizó en días diferentes para calcular la precisión intermedia solo se aplicó a dos niveles de concentración nominal, 0,05 y 0,1 ng/mg de pelo, por ser la concentración de 0,05 ng/mg el límite de detección por parte del instrumento, y 0,1 ng/mg por encontrarse en un

rango relativamente bajo y que puede ser crítico al momento de discriminar entre una muestra positiva de una negativa.

Tabla 4-11: Resultados de Porcentajes de recuperación y porcentajes de error para evaluar exactitud para Δ^9 -THC-TMS

[C] nominal ng/mg	Promedio [C] obtenida (ng/mg) ± Desviación estándar	% Recuperación	% error
0,05	0,065 ± 0,0240	130	30
0,1	0,117 ± 0,0073	117,5	17,5
0,5	0,623 ± 0,0534	124,6	24,6

[C]= Concentración



En relación a la exactitud del método los parámetros que se calcularon fueron porcentajes de recuperación y de error (Tabla 4-11), y se observó que las concentraciones nominales no cumplieron con los criterios de aceptación (Porcentaje de Recuperación entre un 85-115% y el Porcentaje de error \leq 15%).

Se buscó información dentro de los registros del SML, y la anterior experiencia demostraba que la concentración de 0,1 ng/mg tampoco presentaba una precisión intermedia aceptable ya que tenía un coeficiente de variación promedio de la concentración obtenida del 21,32 % (Criterio de aceptación: CV \leq 15%), la concentración nominal de 0,5 ng/mg presentaba al igual que en esta experiencia una buena replicabilidad, dentro de los límites establecidos, mas también hablaba

de una buena precisión y exactitud en el método, pero fueron evaluadas en concentraciones mayores, del orden de 1 ng/mg y de 4 ng/mg de pelo, en modo de inyección PTV.

4.1.2 Extracción mediante columnas *Bond Elut Certify*®

Lo primero que se midió fue el pH de los respectivos ácidos disponibles en el SML, los que se muestran en la Tabla 4-12.

Tabla 4-12: Resultados de la medición de pH para los diferentes ácido empleados.



Ácido	pH
Ácido Fosfórico 50 mM	1
Ácido Acético 1 M	2
Ácido Clorhídrico 1 M	1

La cantidad de volumen que se agregó a cada tubo para alcanzar el pH 1 del ácido fosfórico 50 mM, siendo esta solución la que se emplea para activar la columna de extracción *Bond Elut Certify*®, se resume en la Tabla 4-13, en primer lugar se agregó solo un ácido luego al ir midiendo el pH, se vio que se debía de mezclar con un ácido fuerte, puesto que de no ser así, sería una gran cantidad

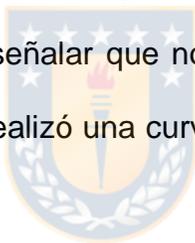
de Volumen, que el tubo de vidrio no podría contener. Señalar además que las muestras de cabello se encuentran en un medio básico y se llevan a un medio ácido para hacerlo afín con la columna de extracción *Bond Elut Certify*®, ya que la interacción entre el analito y la muestra es iónica, por lo que la retención debe ser de la misma afinidad, ya que la columna se activa en medio ácido, por lo tanto, debe encontrarse en este medio la molécula, pero como tras la incubación del pelo se está en medio básico, modificamos el pH a ácido para así hacer pasar la muestra y que sea retenida por la columna.



Tabla 4-13: Detalles del tipo de ácido y volumen aplicado hasta alcanzar el pH 1

Tubo	Tipo de ácido agregado	Volumen agregado (ml)	pH
Tubos 1, 2 y 3 correspondiente a pruebas con Ácido Acético 1 M	Ácido Acético	2,5	6
	1 M	1,5	5
		2	4
		2	4
		2	4
	+ Ácido Clorhídrico 10 M	0,5	3
Tubos 4, 5 y 6 Correspondientes a pruebas con Ácido Clorhídrico 1 M	Ácido Clorhídrico 1 M	2	6
		0,5	1
Tubos 7, 8 y 9 correspondientes a pruebas con Ácido Fosfórico 50 mM	Ácido Fosfórico 50 mM	2	13
		2	13
		5	12
	+ Ácido Clorhídrico 10 M	0,5	7
		0,5	4
		0,5	1

Una vez alcanzado el pH, se continuó con el análisis de las muestras, los resultados se muestran en la Tabla 4-14, tras lo cual podemos darnos cuenta que hay muestras que no son detectadas por el equipo, además el área por cada analito es mucho más baja si es comparado con lo obtenido en la Tabla 4-4; producto de lo mismo, y pensando en que la no detección se podría deber a que el equipo estuviera sucio, en especial la fuente de iones, por residuos de las diversas muestras que son inyectadas, se vuelven a inyectar los viales pero con el equipo limpio, los resultados se observan en la Tabla 4-15, pero una vez más hay analitos que el equipo no detecta y el área sigue siendo baja, incluido el área del estándar interno. Cabe señalar que no se puede calcular la concentración obtenida puesto que no se realizó una curva de calibración para la metodología empleada en este punto.



Debemos de dejar claro que si bien se recomienda una extracción en fase sólida, en la normativa chilena: “GUÍA TÉCNICA TOXICOLOGÍA Y ANÁLISIS DE CANNABIS Y SUS DERIVADOS”, con el empleo de un cartucho adsorbente apolar C8 y las columnas *Bond Elut Certify*®, empleadas en el SML cumplen con el requisito, en la práctica fue inviable. Otro punto que se debe considerar es que al ser una digestión completa del cabello, parte de la matriz interfiere en la extracción en fase sólida, pero que no es influyente en la extracción líquido-

líquido, por eso se obtienen mayores áreas de los analitos a identificar, y se puede llegar a concentraciones más bajas, como lo es 0,05 ng/mg de pelo.

Tabla 4-14: Áreas obtenida para el ion 386 y 389 correspondientes a Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS respectivamente, mediante una extracción en fase sólida, por una combinación de la metodología de análisis de Marihuana en pelo con la metodología de análisis de Marihuana en sangre, (inyectadas en modo Splitless).

Tipo de ácido	Concentración Nominal (ng/mg)	0,05	0,5
Ácido Acético 1 M	Área del ion 386 perteneciente a Δ^9 -THC-TMS	n.d*	102002
	Área del ion 389 perteneciente a Δ^9 -THC-D ₃ -TMS	280037	328331
	Relación de áreas**	-	0,3106
Ácido Fosfórico 50 mM	Área del ion 386 perteneciente a Δ^9 -THC-TMS	n.d*	236692
	Área del ion 389 perteneciente a Δ^9 -THC-D ₃ -TMS	815311	760432
	Relación de áreas**	-	0,3112
Ácido Clorhídrico 1 M	Área del ion 386 perteneciente a Δ^9 -THC-TMS	n.d*	n.d*
	Área del ion 389 perteneciente a Δ^9 -THC-D ₃ -TMS	n.d*	n.d*
	Relación de áreas**	-	-

*n.d: No detectado (analitos no detectados por el equipo).

**La relación de áreas es entre el área del estándar y el área del estándar interno deuterado.

- Analito Δ^9 -THC-TMS no fue detectado por el equipo, por lo tanto, no es posible realizar cálculos.

Tabla 4-15: Áreas obtenida para el ion 386 y 389 correspondientes a Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS respectivamente, mediante una extracción en fase sólida, por una combinación de la metodología de análisis de Marihuana en pelo con la metodología de análisis de marihuana en sangre, (inyectadas en modo Splitless con la fuente de iones completamente limpia).

Tipo de ácido	Concentración Nominal (ng/mg)	0,05	0,5
Ácido Acético 1 M	Área del ion 386 perteneciente a Δ^9 -THC	n.d*	27762
	Área del ion 389 perteneciente a Δ^9 -THC-D ₃	114359	125652
	Relación de áreas**	-	0,2209
Ácido Fosfórico 50 mM	Área del ion 386 perteneciente a Δ^9 -THC	n.d*	61681
	Área del ion 389 perteneciente a Δ^9 -THC-D ₃	346714	259895
	Relación de áreas**	-	0,2373
Ácido Clorhídrico 1 M	Área del ion 386 perteneciente a Δ^9 -THC	n.d*	n.d*
	Área del ion 389 perteneciente a Δ^9 -THC-D ₃	n.d*	n.d*
	Relación de áreas**	-	-

*n.d: No detectado (analitos no detectados por el equipo).

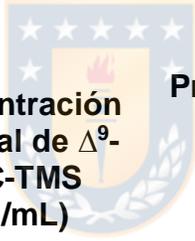
**La relación de áreas es entre el área del estándar y el área del estándar interno deuterado.

- Analito Δ^9 -THC-TMS no fue detectado por el equipo, por lo tanto, no es posible realizar cálculos.

4.2 Resultados y discusión para el Objetivo N°2

En primer lugar, se evaluó la linealidad de la curva de calibración para los cálculos realizados durante el desarrollo de este objetivo; lo anterior se puede observar en la Tabla 4-16 y el Gráfico 4-4:

Tabla 4-16: Curva de calibración para lavados del cabello: Resultados obtenidos de la relación de áreas, promedio de estas y concentración nominal de Δ^9 -THC-TMS para estudio de linealidad.



Concentración nominal de Δ^9-THC-TMS (ng/mL)	Promedio de la Relación de áreas* \pm Desviación estándar
0,05	0,0299 \pm 0,0026
0,08	0,0446 \pm 0,0015
0,1	0,0538 \pm 0,0026
0,5	0,2491 \pm 0,0082
1	0,5110 \pm 0,0186
2,5	1,2013 \pm 0,0322
5	2,0802 \pm 0,0668

*La relación de áreas es entre el área del estándar y el área del estándar interno deuterado.

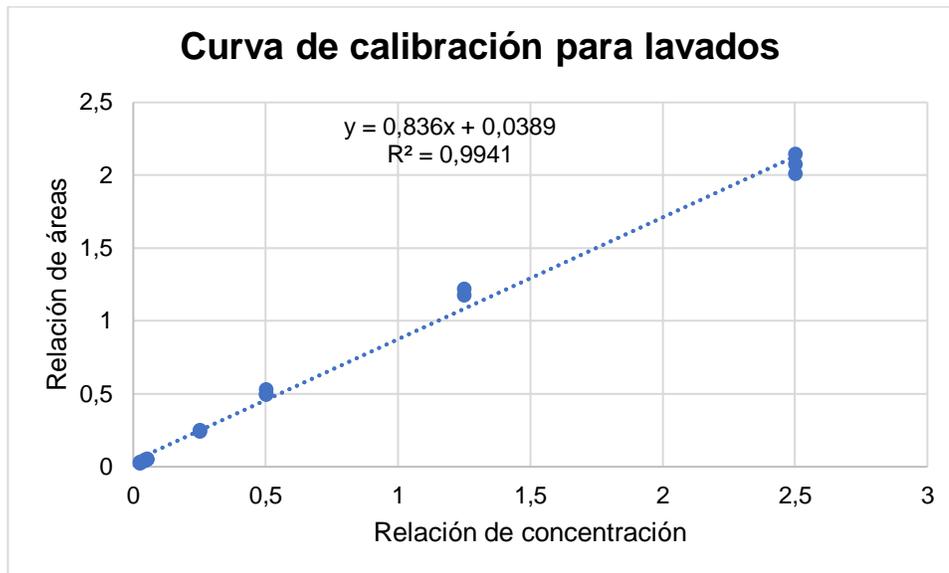


Gráfico 4-4: Curva de calibración de Δ^9 -THC-TMS para lavados de cabello

Al ver la gráfica se observa un buen grado de linealidad con un coeficiente de determinación de $r^2 = 0,9941$ siendo éste cercano a la unidad, lo que sugiere que existe relación entre las relaciones de áreas del analito y la relación de concentración.

4.2.1 Resultados y discusión para la primera parte: Contaminación externa del cabello y lavados según protocolo del SML Concepción

En la Tabla 4-17, se aprecia que las muestras S1, S2 y S3 que fueron expuestas a humo de marihuana, presentan altas concentraciones de Δ^9 -THC, independiente del tipo de pelo que se emplee, aunque hay que señalar que las muestras S1 correspondiente a pelo teñido, pero no decolorado son las más

uniformes, ahora bien, la concentración más baja de la muestra S2.2 se puede deber a que el pelo al momento de ser expuesto, no quedó toda el área bien uniforme y pudo haber solapamiento de mechones de pelo, además podemos evidenciar que los cabellos son retenedores de contaminantes externos y por lo mismo la importancia de realizar una buena descontaminación externa, ya que muchas muestras podrían dar falsos positivo. En bibliografía se ha visto que cabellos grasos atraen más THC que otros, así como cabellos húmedos retienen menos THC producto de la cierta hidrofobicidad de este con el agua. (Duvivier et al. 2016)



Tabla 4-17: Concentración de Δ^9 -THC-TMS en las muestras de cabello expuestas a contaminación externa con humo de marihuana

Tubos	Concentración obtenida* (ng/mg)
S1.1	22,00
S1.2	23,25
S2.1	25,20
S2.2	4,01
S3.1	16,90
S3.2	32,58

S1: Cabello del sujeto N°1: pelo teñido, pero no decolorado. Si es .1 o .2 difiere del número del tubo que se tomó la muestra

S2: Cabello del sujeto N° 2: pelo teñido y decolorado. Si es .1 o .2 difiere del número del tubo que se tomó la muestra

S3: Cabello del sujeto N° 3: pelo natural sin tratamiento cosmético. Si es .1 o .2 difiere del número del tubo que se tomó la muestra

*Las muestras por tiempo y disponibilidad del equipo fueron inyectadas solo una vez, por lo tanto no se presenta desviación estándar.

Se comenzó los lavados con el solvente Diclorometano, analizando cada uno de ellos, en primera instancia se realizaron 3 lavados, respetando lo que la metodología expresaba, pero como se puede ver en la Tabla 4-18, el tercer lavado contenía una alta concentración de Δ^9 -THC, es por ello que se decidió realizar 3 lavados más y analizar cada uno de ellos, si bien los resultados del sexto lavado están en el límite 0,05 ng/mg o por debajo, hay que dejar claro que estas matrices no son extraídas y por ende, se sugiere que las concentraciones que presentaran los lavados deberían ser mucho más bajo que el límite para una extracción, ya que un buen lavado externo debería de asegurar que la presencia del Δ^9 -THC no sea detectada por el equipo.



Debido al alto volumen gastado de Diclorometano estas muestras se dejaron en espera

Tabla 4-18: Concentración de Δ^9 -THC-TMS en los lavados realizados a las muestras de cabello expuestas a contaminación externa con humo de marihuana

Tubos N° del Lavado Concentración (ng/mg)

S1.1	1	8,32
	2	3,93
	3	2,13
	4	0,024
	5	0,022
	6	**

Continua

Tabla 4-18: Concentración de Δ^9 -THC-TMS en los lavados realizados a las muestras de cabello expuestas a contaminación externa con humo de marihuana

Tubos	N° del Lavado	Concentración (ng/mg)
S1.2	1	13,07
	2	6,09
	3	4,44
	4	0,14
	5	0,073
	6	0,052
S2.1	1	10,21
	2	3,71
	3	3,12
	4	0,29
	5	0,10
	6	0,056
S2.2	1	5,02
	2	0,75
	3	0,46
	4	**
	5	**
	6	0,017
S3.1	1*	-
	2	3,98
	3	1,79
	4	0,44
	5	0,092
	6	0,025
S3.2	1	19,13
	2	6,15
	3	5,44
	4	0,55
	5	0,25
	6*	-

*El lavado 1 de la muestra S3.1 y el lavado 6 de la muestra S3.2 no se inyectaron en el equipo ya que se rompió el inserto del vial que los contenía.

** No es posible realizar el cálculo de la concentración de Δ^9 -THC.

S1: Cabello del sujeto N°1: pelo teñido, pero no decolorado. Si es .1 o .2 difiere del número del tubo que se tomó la muestra

S2: Cabello del sujeto N° 2: pelo teñido y decolorado. Si es .1 o .2 difiere del número del tubo que se tomó la muestra

S3: Cabello del sujeto N° 3: pelo natural sin tratamiento cosmético. Si es .1 o .2 difiere del número del tubo que se tomó la muestra

4.2.2 Resultados y discusión para la segunda parte: Elección de nuevos solventes para el Lavado

En vista de los resultados anteriores se decidió buscar una alternativa de lavado, y tras una revisión bibliográfica se llegó a la conclusión de emplear una serie de solventes, usando los mismos tiempos que para el tratamiento con Diclorometano (1 min en vortex y 10 min en agitador multi RS), al ser 3 solventes distintos más el agua, se reemplazó repetir por triplicado y solo lavar una vez con cada solvente, pero al analizar el primer lavado, se obtuvo que era insuficiente como muestra la Tabla 4-19, y se prosiguió con 2 ciclos de lavados más, dando el resto de los resultados que muestra la Tabla 4-19. Una vez que se obtuvieron extractos limpios, se procedió a realizar una extracción de THC en matriz pelo, para asegurarnos que las muestras presentaban una cantidad de THC por debajo del límite de detección del equipo y del *cut-off* que indica la *SoTH*, que corresponde en ambos casos a 0,05 ng/mg de pelo; para la muestra S2.1 la concentración encontrada fue de 0,022 ng/mg de pelo, para la muestra S2.2 la concentración encontrada fue de 0,029 ng/mg de pelo, la muestra S1.2 no se extrajo puesto que cuando se analizó el lavado tercero de Diclorometano, se apreció una cantidad

considerable en el cromatograma y por ello, se dejó a la espera de realizar más lavados, pero por falta de tiempo no se continuó. De lo anterior se desprende que si bien los lavados no detectaban la presencia de Δ^9 -THC, en las extracciones si se puede apreciar, aunque a un nivel por debajo del límite de positividad de una muestra correspondiente a una concentración mayor a 0,05 ng/mg de pelo.

Tabla 4-19: Concentración de Δ^9 -THC-TMS en los diferentes solventes empleados en el lavado nuevo, por todos los ciclos de lavados a los cuales fueron sometidas de las muestras de cabello expuestas a contaminación externa con humo de marihuana



Tubos	N° del Lavado	Tipo de solvente	Concentración (ng/mg)
S1.2	1	Acetona	n.d*
		Metanol	11,56
		Diclorometano	5,08
	2	Acetona	0,32
		Metanol	1,62
		Diclorometano	0,69
	3	Acetona	**
		Metanol	0,19
		Diclorometano	0,040
S2.1	1	Acetona	4,17
		Metanol	2,21
		Diclorometano	1,17
	2	Acetona	**
		Metanol	0,36
		Diclorometano	0,0077
	3	Acetona	n.d*
		Metanol	n.d*
		Diclorometano	n.d*

Continua

Tabla 4-19: Concentración de Δ^9 -THC-TMS en los diferentes solventes empleados en el lavado nuevo, por todos los ciclos de lavados a los cuales fueron sometidas de las muestras de cabello expuestas a contaminación externa con humo de marihuana

Tubos	N° del Lavado	Tipo de solvente	Concentración (ng/mg)
S2.2	1	Acetona	2,95
		Metanol	1,71
		Diclorometano	0,90
	2	Acetona	**
		Metanol	0,25
		Diclorometano	**
	3	Acetona	n.d*
		Metanol	**
		Diclorometano	n-d*

*n.d: No detectado (analito Δ^9 -THC-TMS no detectado por el equipo).

** No es posible realizar el cálculo de la concentración de Δ^9 -THC.

4.2.3 Resultados y discusión para la tercera parte: Pruebas de contaminación externa y variaciones del lavado

Con todo lo anterior se decidió realizar una nueva experiencia en donde se puso a prueba nuevamente el solvente de rigor, Diclorometano, más el lavado nuevo como se explicó en la Tabla 3-4, al igual que la primera experiencia, se comenzó con una extracción de Δ^9 -THC de una muestra de pelo de los tubos expuestos a humo de Marihuana, en la Tabla 4-20; se aprecia que hay una variedad en la

concentración de Δ^9 -THC entre los días del pelo expuesto al humo de marihuana, esto podría deberse principalmente a que parte del Δ^9 -THC podría quedar atrapado en las paredes del contenedor, debido a su afinidad con el polipropileno (material que están hechos los tubos de centrifuga) , a alguna fuga del humo por la tapa (aunque esta fue sellada con para film), u otro punto puede deberse a la capacidad pulmonar del tercer involucrado, ya que a medida que llenaba los tubos haya ido decayendo, otro factor importante es que la concentración de Δ^9 -THC no es uniforme dentro de la planta y por ende cada una de las porciones fumadas, van a ser de concentraciones diferentes; al analizar lo encontrado nos sugiere que más que los días de exposición del pelo al humo importa la concentración de Δ^9 -THC, conclusiones que son rectificadas según bibliografía. (Duvivier et al. 2016) (Molnar, 2013).

Tabla 4-20: Concentración de Δ^9 -THC-TMS en las muestras de cabello expuestas a contaminación externa con humo de marihuana

Tubos	Concentración** (ng/mg)
Día* 1	20,98
Dia* 4	4,61
Dia* 7	10,59

* Cantidad de tiempo que pasó el cabello en contacto con el humo de marihuana.

**Las muestras por tiempo y disponibilidad del equipo fueron inyectadas solo una vez, por lo tanto no se presenta desviación estándar.

Respecto a los lavados Tipo 1 y Tipo 2, se realizaron en forma uniforme 6 lavados con la mitad del solvente (4 mL) [En el anexo 1 se señala lavar 3 veces el cabello con 8 mL de Diclorometano en cada lavado], poniendo a prueba parte de la teoría del reparto en una extracción líquido-líquido, pero aplicable en este caso ya que se necesita que los contaminantes externos del pelo se disuelvan en el solvente que se emplea de lavado, por eso se usaron 6 lavados con la mitad del volumen ya que es más eficiente una extracción con n porciones de un volumen V/n de disolvente de extracción, que una sola extracción con un volumen V de disolvente. Por lo tanto, cuanto mayor sea el número de extracciones con volúmenes pequeños de disolvente de extracción, mayor será la cantidad de producto extraído, o dicho de otra forma, “mejor muchos de poco que pocos de mucho” (Angurell et al.2020), los resultados de cada tipo de lavado según el día de exposición del pelo al humo de marihuana se puede observar en la Tabla 4-21, en donde tanto para los lavados tipo 1 y tipo 2 son insuficientes por lo mismo se siguió lavando hasta llegar a concentraciones muy bajas, tal como muestra la Tabla 4-22, en donde se señala el número final de lavados para alcanzar niveles muy bajos o no detectados por el equipo de Δ^9 -THC; ahora bien hay que señalar que al analizar los lavado Tipo 3, los resultados no presentaban niveles de Δ^9 -THC detectados por el equipo, por lo tanto se procedió a analizar cada lavado realizado hasta dar con concentraciones considerables de Δ^9 -THC, como se ve en la Tabla 4-23, pudiendo encontrarlo dependiendo del día, en el Metanol 2 o

en el metanol 1, se decidió dejar el lavado con Diclorometano, para asegurar una mejor limpieza del cabello.

Tabla 4-21: Concentración de Δ^9 -THC-TMS presente en los remanentes de solvente de los lavados de las muestras contaminadas con humo de marihuana por tiempo de exposición.

Tubos*	Tipo de lavado y N° del Lavado	Concentración (ng/mg)
Día 1	Lav 1, N°6	0,27
	Lav 2, N°6	0,035
	Lav 3,D2	n.d
Día 4	Lav 1, N°6	0,088
	Lav 2, N°6	n.d
	Lav 3,D2	n.d
Día 7	Lav 1, N°6	**
	Lav 2, N°6	n.d
	Lav 3,D2	n.d

n.d: No detectado (analito Δ^9 -THC-TMS no detectados por el equipo); Lav 1: Lavado tipo 1, Lav 2: Lavado Tipo 2; Lav 3: Lavado Tipo 3; D2: Lavado con Diclorometano por segunda vez.

* Cantidad de tiempo que pasó el cabello en contacto con el humo de marihuana.

** No es posible realizar el cálculo de la concentración de Δ^9 -THC.

Tabla 4-22 Concentración de Δ^9 -THC-TMS presente en los remanentes finales de solvente de lavados, para aquellas muestras contaminadas con humo de marihuana, a las cuales se debieron de agregar más lavados.

Tubos* Tipo de lavado y N° del Lavado Concentración (ng/mg)

Día 1	Lav 1, N° 11	**
	Lav 2, N° 9	n.d
Día 4	Lav 1, N° 9	n.d
Día 7	Lav 1, N° 8	**

n.d: No detectado (analito Δ^9 -THC-TMS no detectados por el equipo); Lav 1: Lavado tipo 1, Lav 2: Lavado Tipo 2.

* Cantidad de tiempo que pasó el cabello en contacto con el humo de marihuana.

** No es posible realizar el cálculo de la concentración de Δ^9 -THC.



Tabla 4-23: Concentración de Δ^9 -THC-TMS de los remanentes del Lavado Tipo 3 de las muestras de cabello contaminadas con humo de marihuana.

Tubos* Tipo de solvente y N° del Lavado Concentración (ng/mg)**

Día 1	Diclorometano 1	n.d
	Metanol 2	***
	Metanol 1	0,036
	Acetona 2	0,67
Día 4	Diclorometano 1	n.d
	Metanol 2	n.d
	Metanol 1	0,10
	Acetona 2	1,77

Continúa

Tabla 4-23: Concentración de Δ^9 -THC-TMS de los remanentes del Lavado Tipo 3 de las muestras de cabello contaminadas con humo de marihuana

Tubos*	Tipo de solvente y N° del Lavado**	Concentración (ng/mg)
Día 7	Diclorometano 1	n.d
	Metanol 2	0,48
	Metanol 1	0,69
	Acetona 2	1,05

n.d: No detectado (analito Δ^9 -THC-TMS no detectados por el equipo).

* Cantidad de tiempo que pasó el cabello en contacto con el humo de marihuana.

** Los números 1 o 2 hacen alusión a la repetición que se hizo por cada solvente.

*** No es posible realizar el cálculo de la concentración de Δ^9 -THC.

Una vez que los lavados dieron bajo el límite que puede detectar el equipo, las muestras fueron extraídas dando los resultados de la Tabla 4-24, en donde los lavados tipo 1 y 2 que corresponden solo a lavados con Diclorometano, presentaron en su extracción concentraciones altas de Δ^9 -THC, mientras que los correspondientes al Lavado tipo 3 no son detectadas por el equipo. En la Tabla 4-25, se resume lo encontrado en el último lavado y la extracción, por lo que se demuestra que el Solvente Diclorometano es insuficiente para eliminar residuos de Δ^9 -THC externos en el cabello, esto se suma a lo encontrado en bibliografía referente a que el uso repetitivo de un solo solvente de lavado, no es suficiente

para extraer en su totalidad la contaminación externa, de ahí que debe ser una mezcla de solventes. (Duvivier et al. 2016).

Tabla 4-24 Concentración de Δ^9 -THC-TMS en las diferentes muestras contaminadas con humo de marihuana, una vez realizada la descontaminación externa por medio de los lavados, y extraídas según la metodología de análisis de marihuana en pelo.

Tubos**	Tipo de lavado y N° del Lavado	Concentración (ng/mg)
Día 1	Lav 1	0,42
	Lav 2	0,17
	Lav 3	n.d
Día 4	Lav 1	0,10
	Lav 2	0,33
	Lav 3	n.d
Día 7	Lav 1	0,53
	Lav 2	0,39
	Lav 3	n.d

*n.d: No detectado (analito Δ^9 -THC-TMS no detectados por el equipo).

** Cantidad de tiempo que pasó el cabello en contacto con el humo de marihuana.

Tabla 4-25: Tabla resumen, referente a la cantidad total de lavados que se aplicó a cada muestra y las concentraciones de Δ^9 -THC-TMS, encontradas en sus respectivos análisis

Tubo	Tipo de lavado	Número de lavados final	Concentración del lavado (ng/mL)	Concentración de la extracción (ng/mg)
Día 1	1	11	**	0,42
	2	9	-	0,17
	3	Hasta D2	-	-

Continúa

Tabla 4-25: Tabla resumen, referente a la cantidad total de lavados que se aplicó a cada muestra y las concentraciones de Δ^9 -THC-TMS, encontradas en sus respectivos análisis.

Tubo	Tipo de lavado	Número de lavados final	Concentración del lavado (ng/mL)	Concentración de la extracción (ng/mg)
Día 4	1	9	-	0,10
	2	6	-	0,33
	3	Hasta D2	-	-
Día 7	1	8	*	0,53
	2	6	-	0,39
	3	Hasta D2	-	-

D2= Diclorometano 2

- Analito Δ^9 -THC-TMS no fue detectado por el equipo, por lo tanto, no es posible realizar cálculos.

* No es posible realizar el cálculo de la concentración de Δ^9 -THC.

Con todos los resultados, se quiso optimizar el Lavado Tipo 3, en búsqueda de reducir el tiempo de lavado, se tomó una muestra del Tubo 2 Día 4, este tubo se extrajo por primera vez cuando se trasvasió a un tubo nuevo y el extracto seco se guardó hasta cuando fuera necesario analizarlo, luego se tomó una segunda muestra con una diferencia aproximada de 2 meses con el fin de saber si la concentración había variado con el tiempo, los resultados arrojaron que sí, pasando de una concentración original de 5,30 ng/mg de pelo a 2,53 ng/mg de pelo, la explicación de este descenso se debería a que la muestra no es uniforme en todo su contenido, pudiendo haber partes que no quedaron del todo expuestas

en un inicio y que quedaron con una menor concentración de Δ^9 -THC, además de la afinidad de analito con las paredes del contenedor. Aun así se trabajó con las muestras según lo indicado Tabla 3-5, los resultados se encuentran en la Tabla 4-26, en donde se probaron 3 formas de aplicar el lavado comparando con la forma original (Forma D); la Forma A: Cada reactivo solo 1 vez, agitado en vortex 2 minutos y 20 minutos en Agitador Multi RS, se descarta ya que hay presencia de Δ^9 -THC; la Forma B: Cada reactivo 2 veces consecutivas, agitado en vortex 2 minutos y luego 15 minutos en Agitador Multi RS, al analizarlo el equipo no es capaz de detectar la presencia de Δ^9 -THC, lo que nos sugiere que se podría utilizar, por último la Forma C: Cada reactivo 2 veces consecutivas, Agitado en vortex 2 min y 10 minutos en Agitador Multi RS, si bien da una concentración muy por debajo del límite, al analizar el cromatograma, se puede apreciar un leve pick.

Tabla 4-26: Concentración de Δ^9 -THC-TMS en los remanentes del Lavado Tipo 3 según las variaciones que se aplicaron a este lavado para la muestras Día 4 Tubo 2, de cabello contaminadas con humo de marihuana.

Tubos	Concentración (ng/mL)
A	0,04
B	n.d
C	*
D	n.d

n.d: No detectado (analito Δ^9 -THC-TMS no detectados por el equipo).

* No es posible realizar el cálculo de la concentración de Δ^9 -THC.

4.3 Resultados y discusión para el Objetivo N° 3

En primer lugar, se evaluó la linealidad de la curva de calibración para los cálculos realizados durante el desarrollo de este objetivo; lo anterior se puede observar en la Tabla 4-27 y el Gráfico 4-5 (en este caso hay una salvedad puesto que se cargaron tubos con las concentraciones nominales 0,05 ng/mg y 0,08 ng/mg de pelo, pero que no fueron detectados por el equipo):

Tabla 4-27 Curva de calibración: Resultados obtenidos de la relación de áreas, promedio de estas y concentración nominal de metodología analítica “Análisis de Marihuana en pelo combinada con el Análisis de Cocaína en pelo” realizada en tubos de centrifuga para Δ^9 -THC-TMS para estudio de linealidad.

Concentración nominal de Δ^9-THC (ng/mg)	Promedio de Relación de áreas Δ^9-THC/Δ^9-THC-D₃ ± Desviación estándar
0,1	0,1022±0,0052
0,3	0,1855±0,0207
0,5	0,2497±0,0206
1,0	0,5707±0,0409
5,0	2,3862±0,1078
10,0	3,9937±0,0793

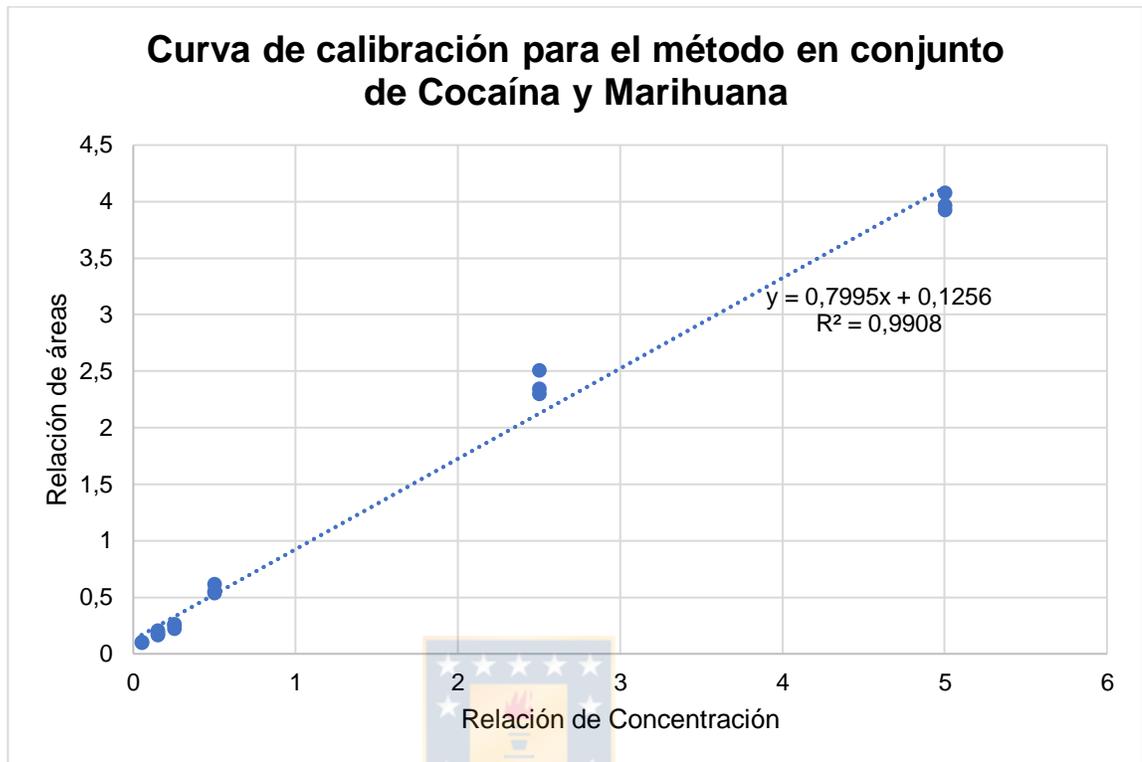


Gráfico 4-5: Curva de calibración para el método en conjunto de Cocaína y marihuana

Al ver la gráfica se observa un buen grado de linealidad con un coeficiente de determinación de $r^2 = 0,9908$ siendo éste cercano a la unidad, lo que sugiere que existe relación entre las relaciones de áreas del analito y su relación de concentración.

En primer lugar se realizó una prueba con una concentración nominal de 5 ng/mg de pelo de Δ^9 -THC, aplicados a 2 tubos de centrifuga, uno con matriz pelo y el otro no, los resultados se muestran en la Tabla 4-28, en donde se aprecia que la

recuperación en función del área obtenida es mucho mayor en muestras con matriz pelo que sin matriz, pero la concentración obtenida es mayor sin la matriz pelo, ahora bien que los resultados con matriz pelo hayan dado áreas más altas que sin la matriz se asocia a una función que se aplica al instrumento denominada "Autotune" un sistema de autochequeo de las condiciones internas del espectrómetro de masas, que permite el ajuste y calibrado de las señales de masas.

Tabla 4-28: Áreas obtenidas de Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS, relación de áreas y concentración real obtenida para la primera prueba de aplicar la metodología en conjunto de Análisis de Cocaína y Marihuana en pelo.

Tubo	Área del ion 386 perteneciente a Δ^9-THC	Área del ion 389 perteneciente a Δ^9-THC-D₃	Relación de áreas	Concentración (ng/mg)
Sin pelo	318327	164010	1,94089	4,54
Con pelo	606417	341648	1,77497	4,12

Lo anterior es importante puesto que las muestras que lleguen al laboratorio son en matriz pelo, en donde a simple vista se está recuperando un 82,4 % con un porcentaje de error del 17,6%, un valor alto este último, siendo aceptado un valor menor o igual al 15%, si se analiza más fríamente este valor es insignificante ya que lo que se pretende es dar por positiva o negativa una muestra y en este caso claramente es positiva al analito. Pero qué ocurre con muestras que presentan

concentraciones más bajas del analito, para ello se probaron 4 concentraciones nominales (0,05 ng/mg, 0,5 ng/mg, 1 ng/mg y 5 ng/mg de Δ^9 -THC) los resultados se encuentran en la Tabla 4-29, en la cual la concentración de 0,05 ng/mg no se detectó por parte del equipo, y se debe recalcar que esta es la concentración límite para identificar por medio de la técnica analítica utilizada si la muestra es considerada como positiva o negativa, ya que si una muestra da una concentración inferior esta no es posible de cuantificar y por lo tanto es declarada como negativa.

Tabla 4-29: Concentraciones de Δ^9 -THC-TMS, su porcentaje de recuperación y porcentaje de error obtenidos de aplicar la metodología en conjunto de Análisis de Cocaína y Marihuana en pelo.

Concentración nominal de Δ^9 -THC-TMS (ng/mg)	Concentración obtenida (ng/mg)	% de recuperación	% de error
0,05	n.d	-	-
0,5	0,10	21,37	78,6
1,0	0,41	41,45	58,5
5,0	3,45	69,07	30,9

n.d: No detectado (analito Δ^9 -THC-TMS no detectado por el equipo).

- Analito Δ^9 -THC-TMS no fue detectado por el equipo, por lo tanto, no es posible realizar cálculos.

Se debe agregar que los porcentajes de recuperación y de error no son favorables, puesto que los porcentajes de error son bastante altos.

A la vez se decidió comparar el efecto del vidrio y los tubos de centrifuga, a una concentración nominal de 1,0 ng/mg de pelo, resultados en la Tabla 4-30, se aprecia que el vidrio da mayores áreas de recuperación que el material de plástico, aunque en concentración obtenida no es mucha la diferencia, si se deja ver claramente que existe una variabilidad en cuanto a la concentración obtenida en comparación a los resultados de la Tabla 4-29, ya que siendo la misma concentración cargada (1 ng/mg) en tubos de centrifuga de la misma partida se obtuvieron 2 concentraciones diferentes, en la primera 0,41 ng/mg y en la segunda 0,91 ng/mg. Esta variabilidad podría deberse a un error en la realización de la extracción por parte del operario, así como al efecto del derivatizante puesto que al ser sustancias altamente reactivas deben almacenarse en frío y protegerse de la humedad, condiciones de humedad que claramente en la zona de Concepción no son del todo cumplidas, a prior se podría suponer que a los niveles bajos la metodología no es exacta, pero al no ser este un trabajo de validación, no se realizaron los ensayos suficientes ni se midieron los parámetros necesarios para poder concluir.

Tabla 4-30: Áreas obtenidas de Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS, relación de áreas y concentración real obtenida para tubo de plástico y vidrio por la metodología en conjunto de Análisis de Cocaína y Marihuana en pelo.

Tubo	Área del ion 386 perteneciente a Δ^9 -THC	Área del ion 389 perteneciente a Δ^9 -THC-D ₃	Relación de áreas	Concentración nominal de Δ^9 -THC (ng/mg)	Concentración obtenida (ng/mg)
Plástico	474601	968817	0,489877	1,0	0,911
Vidrio	547619	1111669	0,49261	1,0	0,918*

* Esta concentración es solo referencial, puesto que la curva en la cual fue interpolada fue realizada en tubos de centrifuga, mientras que este punto es vidrio.

Debido a lo obtenido con ambas experiencias se decidió probar un rango bajo de Δ^9 -THC, en donde se seleccionaron 5 puntos: 0,05 ng/mg, 0,08 ng/mg, 0,1 ng/mg, 0,3 ng/mg y 0,5 ng/mg; como extra se probaron además las concentraciones de 0,05 ng/mg y 0,08 ng/mg de Δ^9 -THC, en tubos de vidrio limpios para comparar con los resultados obtenidos de tubos de centrifuga. Los resultados se presentan en las Tablas 4-31 y 4-32.

Tabla 4-31: Áreas obtenidas de Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS, relación de áreas y concentración real obtenida la metodología en conjunto de Análisis de Cocaína y Marihuana en pelo en tubo de plástico.

Tubo	Área del ion 386 perteneciente a Δ^9 -THC-TMS	Área del ion 389 perteneciente a Δ^9 -THC-D ₃ -TMS	Relación de áreas	Concentración nominal de Δ^9 -THC (ng/mg)	Concentración real (ng/mg)
1	n.d	1252735	-	0,05	-
2	n.d	841265	-	0,08	-
3	65575	1168958	0,05609	0,1	*
4	161875	1073720	0,15076	0,3	0,0629
5	351120	1342018	0,26163	0,5	0,3403

n.d: No detectado (analito Δ^9 -THC-TMS no detectado por el equipo).

* No es posible realizar el cálculo de la concentración de Δ^9 -THC.

- Analito Δ^9 -THC-TMS no fue detectado por el equipo, por lo tanto, no es posible realizar cálculos.

Tabla 4-32: Áreas obtenidas de Δ^9 -THC-TMS y Δ^9 -THC-D₃-TMS, relación de áreas y concentración real obtenida por la metodología en conjunto de Análisis de Cocaína y Marihuana en pelo en tubos vidrio.

Tubo	Área del ion 386 perteneciente a Δ^9 -THC	Área del ion 389 perteneciente a Δ^9 -THC-D ₃	Relación de áreas	Concentración nominal de Δ^9 -THC (ng/mg)	Concentración real (ng/mg)
1	8040	224164	0,03586	0,05	*
2	7843	258819	0,03030	0,08	*

*No es posible realizar el cálculo de la concentración de Δ^9 -THC.

De ambas Tablas 4-31 y 4-32 se puede deducir que con el método no es posible detectar rangos bajos de Δ^9 -THC, ahora si al emplear tubos de vidrio pareciera

haber mejor recuperación por temas de tiempo, no se realizó un mayor número de pruebas.

4.4 Resultados y discusión para el Objetivo N°4

En primer lugar se hizo una revisión de datos proporcionados por el Servicio Médico Legal, los cuales se presentan en la Tabla 4-33, en donde se seleccionaron 20 muestras finalmente las cuales cumplían con tener antecedentes de consumo de Marihuana (ya sea porque la muestra de cabello está asociada a una toma de muestra de orina que dio positivo al análisis o por la información que proporcionó el individuo al momento de la toma de muestra), que dieran positivo al análisis de cocaína en pelo, que hubiesen cumplido el plazo de custodia, y ya disponibles para eliminación y que presentaran matriz suficiente para tomar aproximadamente 200 mg de pelo; una vez reunidas las muestras se procedió a realizar la eliminación de la contaminación externa del pelo, y para ello se empleó el nuevo lavado de cabello, el cual consiste a grandes rasgos en emplear 4 solventes diferentes (Agua-Acetona-Metanol-Diclorometano) cada uno por separado, estando cada solvente en contacto con el cabello por 22 minutos por 2 veces. Una vez realizado el lavado, se secó bajo una corriente de Nitrógeno, se cortó en pequeñas porciones asemejando una forma de polvo y se pesó por cada muestra 2 papelillos con 100 mg de cabello cada una que fueron depositadas en tubos de centrifuga según el análisis que se realizase. Los resultados se presentan en las Tablas 4-34 y 4-35.

Tabla 4-33: Información extraída de la base de datos del Servicio Médico Legal 2019 referente a muestras de pelo

Muestra	Orina relacionada a la toma de muestra de cabello	Resultado de orina para THC	Resultado análisis pelo	Apreciación clínica
6	5	(-)	Negativo	Dice que no consume
16	15	(-)	Negativo	Dice que no consume
506	505	(-)	Coc	Consume pasta base, marihuana
673	672	(-)	Coc	Dice que no consume
780	779	(-)	Coc y cocaetileno	Dice que no consume
782	781	(-)	Coc, BZG	Consume pasta base, marihuana
991	-	(-)	Coc, BZG, cocaetileno	Consume marihuana
994	993	(+)	Coc, BZG, cocaetileno	Consume pasta base, marihuana y cocaína
997	996	(-)	Negativo	Dice que no consume
1033	1032	(-)	Coc	Consume marihuana y pasta base
1078	1077	(-)	Coc	Dice que no consume
1080	1079	(+)	Coc, BZG, cocaetileno	Consume marihuana
1159	1158	(-)	Coc	Consume pasta base
1161	1160	(-)	Coc y cocaetileno	Consume pasta base
1380	1379	(+)	Coc, BZG, cocaetileno	Consume marihuana
1466	1465	(-)	Coc, BZG, cocaetileno	Dice que no consume
1660	1659	(+)	Coc	Dice que no consume

Continua

Tabla 4-33: Información extraída de la base de datos del Servicio Médico Legal 2019 referente a muestras de pelo

Muestra	Orina relacionada a la toma de muestra de cabello	Resultado de orina para THC	Resultado análisis pelo	Apreciación clínica
1662	1661	(+)	Coc, BZG, cocaetileno	No hay apreciación
1672	1671	(+)	Negativo	Consume marihuana
1811	1810	(-)	Coc, BZG, cocaetileno	Dice que no consume
1813	1812	(+)	Negativo	Consume marihuana
1819	1818	(-)	Negativo	Dice que no consume
1856	1855	(-)	Negativo	Consume marihuana
1877	1876	(-)	Coc	Consume pasta base, marihuana
1883	-	-	Negativo	Consume marihuana
1935	-	-	Negativo	No hay apreciación
2330	2329	(-)	Negativo	Consume marihuana
2616	2615	(-)	Negativo	Dice que no consume
2772	2771	(-)	Negativo	Dice que no consume
2820	2819	(-)	Negativo	Dice que no consume
2842	2841	(-)	Coc	Consume marihuana
2949	-	-	Coc	Consume pasta base
2962	2961	(-)	Negativo	Dice que no consume
3045	3044	(-)	Negativo	Dice que no consume

Se resaltan las muestras que se seleccionaron.

Coc: Cocaína BZG: Benzoilecgonina (-): Muestra Negativo (+): Muestra Positiva
- No hay datos relacionados

Tabla 4-34: Resultados del análisis de las muestras reales para determinar la concentración de los diferentes analitos en estudio analizados por la Metodología de Análisis en conjunto de Cocaína y Marihuana en pelo.

N° de muestra	Concentración de Δ^9 -THC-TMS (ng/mg)	Concentración de Cocaína-TMS (ng/mg)	Concentración de BZG-TMS (ng/mg)
506	n.d	2.56	n.d
673	n.d	17.06	4.91
780	n.d	1.51	0.84
782	n.d	50.07	7.35
991	0,83	17.21	2.78
994	Negativo*	11.24	2.53
1033	n.d	8.00	1.53
1078	n.d	1.60	0.70
1080	n.d	23.68	5.11
1159	n.d	32.93	5.34
1161	n.d	11.38	2.10
1380	n.d	0.48	n.d
1660	n.d	2.03	0.66
1662	n.d	6.06	2.34
1672	n.d	0.67	0.46
1811	n.d	29.11	3.95
1813	n.d	n.d	0.41
1856	n.d	n.d	n.d
1877	n.d	3.36	0.84
1883	0,35	n.d	0.38

n.d: No detectado (analito Δ^9 -THC-TMS no detectado por el equipo).

*Cuando se habla de una muestra Negativa, se hace referencia a que la concentración encontrada se encuentra por debajo del *cut-off* establecido por la SoHT (Para Δ^9 -THC: 0,05 ng/mg). La obtención de un valor mayor al *cut-off* es indicativo de que la metodología utilizada, es capaz de cuantificar al compuesto presente en el pelo y así considerarla como positiva. Por otro lado, un valor bajo al *cut-off* es indicativo de que por medio de la técnica analítica utilizada no es posible cuantificar el analito, siendo la muestra considerada negativa. (Cooper et al. 2011).

Tabla 4-35: Resultados del análisis de las muestras reales para determinar la concentración de los diferentes analitos en estudio analizados por la Metodología de Análisis de Marihuana en pelo

N° de muestra	Concentración de Δ^9-THC-TMS (ng/mg)
506	n.d
673	n.d
780	n.d
782	n.d
991	0,15
994	Negativo
1033	n.d
1078	n.d
1080	n.d
1159	n.d
1161	n.d
1380	Negativo
1660	Negativo
1662	Negativo
1672	Negativo
1811	n.d
1813	Negativo
1856	n.d
1877	n.d
1883	0,22

n.d: No detectado (analito Δ^9 -THC-TMS no detectado por el equipo).

*Cuando se habla de una muestra Negativa, se hace referencia a que la concentración encontrada se encuentra por debajo del cut-off establecido por la SoHT (Para Δ^9 -THC: 0,05 ng/mg). La obtención de un valor mayor al cut-off es indicativo de que la metodología utilizada, es capaz de cuantificar al compuesto presente en el pelo y así considerarla como positiva. Por otro lado, un valor bajo al cut-off es indicativo de que por medio de la técnica analítica utilizada no es posible cuantificar el analito, siendo la muestra considerada negativa. (Cooper et al. 2011).

Los resultados en cada caso se interpolaron en sus respectivas curvas, ahora bien, al analizar las tablas 4-34 y 4-35, se observa que en ambos casos aun empleando dos métodos diferentes, la misma muestra dio positivo, pero al emplear solo el método de determinación de marihuana en pelo, varias muestras más mostraban presencia de Δ^9 -THC, aunque en concentraciones inferiores a 0,05 ng/mg de pelo que como se dijo anteriormente es el límite para informar una muestra por positiva o negativa. Esto nos deja en manifiesto que al realizar la determinación en conjunto de Δ^9 -THC y cocaína los rangos bajos no son detectados por parte del equipo, esto podría deberse al método empleado y que al ser incubado primero por un medio ácido, este afecte a la matriz, si bien no hay afinidad entre el Δ^9 -THC y el ácido Clorhídrico, sumado a que se analizaron los extractos de Cocaína en búsqueda de Δ^9 -THC, no encontrándose presencia de este en ellos, no se puede descartar que en algo afecta al análisis limitando la capacidad de discernir, otro punto importante es el equipo que empleamos para analizar, es probable que las muestras inyectadas si tengan la presencia del Δ^9 -THC, pero se escapa de la capacidad del este para detectarlos.

Ahora bien, al momento de analizar los resultados obtenidos en relación a nuestro segundo analito de interés que es la Cocaína y ver si el lavado afecto o no que la muestra diera positiva, nos encontramos con resultados un tanto diferentes a los que habían sido informados, estos se presentan en la Tabla 4-36, donde se

deja ver que en 2 muestras para el analito Cocaína no se coincide, mientras que en las restantes en su mayoría se encontró una concentración mayor a la informada. Algo que llama mucho más la atención fueron los resultados obtenidos para Benzoilecgonina (BZG), donde en 9 muestras no se coincide, ahora bien, con esta experiencia, se pudo identificar que el lavado no afecta que una muestra de positiva o negativa para el analito Cocaína, pero lo que si demuestra es la variabilidad que existe al usar la matriz pelo. Como el crecimiento de este es por convención 1 cm al mes, los analitos van a variar dependiendo de la zona en que se tome la muestra a analizar, es por ello que se sugiere que si se quiere conocer lo más próximo en el tiempo se analice lo más cercano a la raíz del pelo, como los análisis se realizaron en un inicio en los 3 primeros centímetros de cabello, una vez que se tomó una segunda muestra se emplearon 3 centímetros de la zona siguiente, es por ello que se encontró diferencias en las concentraciones. Otra prueba de esta variabilidad se basó en que se realizó una experiencia de determinación de Δ^9 -THC con muestras recién peritadas para Cocaína, en donde se emplearon los residuos, los resultados se encuentran en la Tabla 4-37, en donde si lo comparamos con las Tablas 4-34 y 4-35, principalmente con la Tabla 4-34, ya que se analizó primero para Cocaína y luego tomando los residuos se analizó para Δ^9 -THC, se puede apreciar que 2 muestras (1662 y 1877) dieron positivo la primera vez, mientras que la segunda vez no fueron detectadas por el equipo, pero al comparar con el método de análisis solo para Δ^9 -THC, si bien dieron negativo, nos muestra que las muestras si tenían presencia del analito; y

en relación a lo mismo 2 muestras (1380 y 1660) que no fueron detectadas por el equipo en la primera instancia, ni en la segunda, resultaron negativas al análisis solo para Δ^9 -THC. Con esto se prueba la importancia de la toma de muestra y de dejar claramente rotulado cual es la zona más cercana a la raíz del pelo.

Tabla 4-36: Tabla comparativa de las concentraciones de Cocaína y BZG obtenidas durante el desarrollo del trabajo con las concentraciones informadas por el servicio médico legal de concepción.

N° de muestra	Concentración de Cocaína informada (ng/mg)	Concentración de Cocaína obtenida (ng/mg)	Concentración de BZG informada (ng/mg)	Concentración de BZG obtenida (ng/mg)
506	1.47	2.56	negativo	Negativo
673	2.61	17.06	negativo	4.91
780	1.11	1.51	negativo	0.84
782	52.55	50.07	4.15	7.35
991	19.23	17.21	0.96	2.78
994*	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1033	8.08	8.00	Negativo	1.53
1078	0.58	1.60	negativo	0.70
1080	18.79	23.68	0.55	5.11
1159	4.97	32.93	negativo	5.34
1161	9.22	11.38	negativo	2.10
1380	1.10	Negativo	0.54	negativo
1660	1.65	2.03	negativo	0.66
1662	20.99	6.06	5.62	2.34
1672	negativo	0.67	negativo	negativo
1811	19.44	29.11	1.80	3.95
1813	negativo	Negativo	negativo	negativo
1856	negativo	Negativo	negativo	negativo
1877	2.14	3.36	negativo	0.84
1883	negativo	Negativo	negativo	negativo

*muestra correspondiente a vello púbico por lo tanto no se analiza concentración sino que solo presencia o ausencia del analito.

**Cuando se habla de una muestra Negativa, se hace referencia a que la concentración encontrada se encuentra por debajo del *cut-off* establecido por la SoHT (Para Cocaína y BZG: 0,5 ng/mg). La obtención de un valor mayor al *cut-off* es indicativo de que la metodología utilizada, es capaz de cuantificar al compuesto presente en el pelo y así considerarla como positiva. Por otro lado, un valor bajo al *cut-off* es indicativo de que por medio de la técnica analítica utilizada no es posible cuantificar el analito, siendo la muestra considerada negativa. (Cooper et al. 2011).

Tabla 4-37: Resultados del análisis previo a muestras reales para determinar la concentración de Δ^9 -THC-TMS por la Metodología de Análisis en conjunto de Cocaína y Marihuana en pelo

Muestra	Concentración de Δ^9 -THC-TMS (ng/mg)
1380	-
1660	-
1662	0,66
1877	0,33
2842	0,08

- Analito Δ^9 -THC-TMS no fue detectado por el equipo, por lo tanto, no es posible realizar cálculos.

En forma paralela se analizaron 3 muestras de cabello, de 3 individuos diferentes que solo son consumidores ocasionales de Marihuana, dicha matriz se dividió en dos, una parte fue analizada sin lavar y la otra se sometió al Lavado Tipo 3, en donde se recolectó el último remanente de solvente, el cual se inyectó en el equipo para analizarlo, una vez lavado el cabello se realizó todo el proceso de análisis de Marihuana en pelo, los resultados se muestran en la Tabla 4-38, aquí se aprecia que el lavado no presenta residuos de Δ^9 -THC, la muestra P3 no

presenta datos para la muestra sin lavar, solo analizada, esto debido a que estaba en una cantidad insuficiente para realizar los dos análisis, así que se priorizo tratar la muestra con los lavados; la muestra P1 nos representa lo que queremos evitar tener falsos positivos producto de una mala descontaminación del cabello, pudiendo dar como positiva una muestra negativa (basándonos en que el límite es una concentración $\geq 0,05$ ng/mg de pelo); la muestra P2 según la información recabada no había tenido un consumo de Marihuana reciente, por lo mismo la muestra analizada sin lavar no detecto Δ^9 -THC, ahora bien debería de al menos dar una concentración semejante a la muestra que fue lavada, el que haya esta diferencia se basa en que se trabajó con un mechón de pelo de aproximadamente 30 cm de largo, en todo su largo, no empleando solo los 3 primeros centímetros por lo mismo puede que cuando se pesó la muestra se tomara más pelo del extremo final que del se encuentra más hacia la raíz y como sabemos entre más cerca se está del extremo final, menor va a ser la cantidad de analito que se va a encontrar, producto que existe una perdida a través del tiempo. Por otro lado, la muestra P3 al ser analizada no se detectó la presencia del analito.

Tabla 4-38: Resultados de las concentraciones de Δ^9 -THC en muestras reales de consumidores de Marihuana, considerando las muestras sin y con descontaminación de la matriz pelo.

Muestra	Resultado lavados	Concentración de Muestra sin lavar (ng/mg)	Concentración de Muestra con lavado (ng/mg)
P 1	n.d	0,098	0,048
P 2	n.d	n.d	0,052
P 3	n.d	Sin datos	n.d

n.d: no se detecta



5. CONCLUSIONES

Con respecto al cambio en el modo y volumen de inyección de 10 μL en modo PTV a 2 μL en modo Splitless es posible realizarlo, pero los resultados del método no son ni exactos ni precisos para concentraciones nominales bajo los 0,5 ng/mg de cabello, además no se puede emplear una extracción en fase sólida, por lo tanto, se debe continuar con la extracción líquido-líquido establecida.

Se dejó demostrado lo poco eficiente que son el Agua más el solvente Diclorometano por si solos para la descontaminación externa del cabello, cambiándose a un lavado que incluye el uso de dos solventes más, en el siguiente orden: Agua, Acetona, Metanol y Diclorometano, aumentando el tiempo de contacto entre el cabello y el solvente, pasando de 11 minutos por triplicado con el Diclorometano a 22 minutos por duplicado para cada uno de los 4 solventes.

Se puede combinar las metodologías de extracción para Cocaína con la de Marihuana empleando los residuos de cabello de la primera, pero la evidencia sugiere que no es recomendable realizarlo ya que la concentración nominal de 0,05 ng/mg (*cut-off* para determinar si una muestra es positiva o negativa para $\Delta^9\text{-THC}$) no pudo ser detectada por el instrumento y el método empleado,

pudiendo alcanzar solo hasta concentraciones nominales de 0,3 ng/mg de pelo, con salvedades de 0,1 ng/mg. Por lo tanto se determina que si bien se puede aplicar ambas metodologías, el análisis de Marihuana en pelo por si solo es mucho más eficiente, ya que es capaz de detectar presencia de Δ^9 -THC en los niveles de corte.

Por último, no fue posible implementar una metodología analítica para la determinación de marihuana y cocaína en conjunto en matriz pelo por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, pero si se sientan las bases a una mejora en el método y abre la posibilidad de poder emplearlo, se recomienda realizar un poco más de experimentación principalmente a lo observado al emplear diferentes tipos de tubos y las variaciones que se producen si son de vidrio versus tubos de centrifuga de polipropileno, aunque hay que evaluar los pro y contra de esto, en principio y según lo observado sería mucho más recomendable que todos los análisis se realizasen en tubos de vidrio.

6. OBSERVACIONES

1. Dentro de la experimentación muchas veces se encontró con el problema de que tras la agitación para realizar la extracción líquido-líquido, se observaba una especie de flóculo en la fase orgánica, que con la centrifugación muchas veces descendía pero en otras no, y lo que se recomienda en caso de presentarse es dejar que la muestra decante sola sin agitar, mínimo 1 hora. En bibliografía se encontró que la extracción líquido-líquido del cabello tiende a generar una emulsión, por lo tanto, esto es lo que se observó. (Lendoiro, 2016) (Society of Hair Testing, 1997)
2. Tras la derivatización en ocasiones se generó una capa de color blanco por sobre lo derivatizado, esto se debe a que el derivatizante entró en contacto con agua, por ser Concepción una ciudad muy húmeda, la recomendación es que cada vez que se emplee, se trabaje en un área cerrada, con desecadores y en lo posible controlar la humedad ambiental, además de que una vez que se coloque a incubar, cerrar cada uno de los viales con para film evitando a toda costa que vaya a entrar una gota de agua.

3. Con la aplicación de la metodología se deja constancia de que sí se quiere realizar un análisis de una muestra de cabello por comparación, la cantidad de muestra tomada debe ser mayor, ya que como se comprobó existe variabilidad entre una sección de pelo y otra.



7. REFERENCIAS

- Angurell, Inmaculada; Casamitjana, Núria. (Ingreso año 2019). Universidad de Barcelona. Operaciones básicas en el Laboratorio de Química, 9. *Extracción*. Recuperado de: http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_fona.html
- Angurell, Inmaculada; Casamitjana, Núria. (Ingreso año 2019). Universidad de Barcelona. Operaciones básicas en el Laboratorio de Química, 9. *Extracción*. Recuperado de: http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html
- Angurell, Inmaculada; Casamitjana, Núria. (Ingreso año 2019). Universidad de Barcelona. Operaciones básicas en el Laboratorio de Química, 9. *Extracción* [acceso: 18-03-2020] Recuperado de: http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html
- Chemistry LibreTexts (2019). *Splitless injection* [acceso: 09/07/2019] Disponible en: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Chromedia/01Gas_Chromatography_\(GC\)/Gas_Chromatography%3A_In_Practice/02Gas_Chromatography%3A_Injection_techniques_and_principles/23Splitless_injection](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Chromedia/01Gas_Chromatography_(GC)/Gas_Chromatography%3A_In_Practice/02Gas_Chromatography%3A_Injection_techniques_and_principles/23Splitless_injection)
- Cooper, G.A.A., Kronstrand, R., Kintz, P. (2011). Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Science International*, (20-24). doi: 10.1016/j.forsciint.2011.10.024
- Cromlab S.L. Blog de Cromatografía, (2015). ACCESORIOS, APLICACIONES, HRGC. *Técnicas de Inyección en HRGC: seleccione el Inserto adecuado. Seleccione el Modo de Inyección más adecuado* [acceso: 09/07/2019] Disponible en: <http://blog.cromlab.es/tecnicas-de-inyeccion-en-hrgc-seleccione-el-inserto-adecuado/>
- Cromlab. S.L (2006-2014). Barcelona. *Extracción en Fase Sólida EFS-SPE* Recuperado de: http://www.cromlab.es/EFS_Principal.htm
- Damin, C., & Grau, G. (2015). Cocaína. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 49(1), 127-134.

- Duvivier, W. F., Peeters, R. J., van Beek, T. A., & Nielen, M. W. (2016). *Evidence based decontamination protocols for the removal of external Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) from contaminated hair. Forensic science international, 259*, 110-118.
- Escobar Toledo, I. E., Berrouet Mejía, M. C., & González Ramírez, D. M. (2009). Mecanismos moleculares de la adicción a la marihuana. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 38(1).
- Figueroa Muñoz, A., Bravo Méndez, R., Triviño Angulo, I., & Hernández, H. G. (2015). Guía técnica toxicología y análisis de cannabis y sus derivados, capítulo 1. Chile: Instituto de Salud Pública.
- Figueroa Muñoz, A., Bravo Méndez, R., Triviño Angulo, I., & Hernández, H. G. (2015). Guía técnica toxicología y análisis de cannabis y sus derivados, capítulo 2. Chile: Instituto de Salud Pública.
- Food and Drug Administration. (2018). *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*.
- Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokin* 2002, in press. [acceso 03-05-20] Recuperado de: <https://www.cannabis-med.org/index.php?tpl=faq&red=faqlist&id=95&lng=es>
- Jurado C. “*El pelo como matriz para el diagnóstico toxicológico.*”. En M. Repetto (ed) *Postgrado en Toxicología*. Ilustre Colegio Oficial de Químicos. Sevilla. CD-ROM. 2012”.
- Kauert, G., & Röhrich, J. (1996). Concentrations of Δ 9-tetrahydrocannabinol, cocaine and 6-monoacetylmorphine in hair of drug abusers. *International journal of legal medicine*, 108(6), 294-299.
- Lendoiro Belío, E. (2016). El pelo como matriz biológica alternativa y su uso en la determinación de la exposición intraútero a drogas ilícitas y fármacos.
- Molnar, A., Lewis, J., & Fu, S. (2013). Recovery of spiked Δ 9-tetrahydrocannabinol in oral fluid from polypropylene containers. *Forensic science international*, 227(1-3), 69-73.

- Observatorio Chileno de Drogas. (2018). Décimo Tercer Estudio Nacional de Drogas en Población General, 2018. Santiago de Chile: SENDA. [acceso: 15/01/2020] Recuperado de: <https://www.senda.gob.cl/wp-content/uploads/2020/02/ENPEG-2018.pdf>
- Oliveró, M. B. (2000). Toxicología del cannabis. *Adicciones*, 12(5), 169-174.
- Santiago, R.P. (2015). Desarrollo y optimización de un método analítico para la determinación de tetrahidrocannabinol (THC) en muestras de orina humana por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM), 45-46. Recuperado de https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_santiago_membrillo.pdf
- Sección de Laboratorio y Asuntos Científicos Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, UNODC. (2010), Viena. Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis (Revisado y actualizado) *MANUAL PARA USO DE LOS LABORATORIOS NACIONALES DE ESTUPEFACIENTES NACIONES UNIDAS Nueva York*. Recuperado de: https://www.unodc.org/documents/scientific/Cannabis_manual-Sp.pdf
- Servicio médico legal (2019). Servicios que entrega SML. Chile: *Servicio médico legal, labor forense*. [acceso: 25/04/2019] Disponible en <http://www.sml.gob.cl/labor-forense.html>
- Servicio médico legal, (2019). El servicio médico legal. Chile: *Servicio médico legal, Quiénes somos*. [acceso: 25/04/2019] Disponible en: <http://www.sml.gob.cl/quienes-somos.html>
- Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol, (2019). *Programas de Prevención » Información sobre drogas » Glosario de Términos*. [acceso: 18/05/2019] Disponible en: <http://www.senda.gob.cl/g-m/>
- Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol, (2019). *Programas de Prevención » Información sobre drogas » Glosario de Términos*. [acceso: 18/05/2019] Disponible en:

<http://www.senda.gob.cl/prevencion/informacion-sobre-drogas/glosario-de-terminos/>

- SGE, Analytical Science.(2016) *GENERAL CATALOGUE EDITION 19, sección 14. Cromatografía*. [acceso: 18-03-20 20] Recuperado de: http://www.vertex.es/wp-content/uploads/2016/11/14.5_Cromatograf%C3%ADa-de-gases.pdf
- Skoog,Holler, Nieman. Principios de Análisis instrumental, quinta edición, Mc Graw Hill, Madrid, 2001, pág 269- 272 y pág 730- 759.
- Society of Hair Testing (SoHT), Statement of the society of hair testing concerning the examination of drugs in human hair, *Forensic Sci. Int.* 84 (1997) 3-6.
- Thorspecken, J., Skopp, G., & Pötsch, L. (2004). In vitro contamination of hair by marijuana smoke. *Clinical chemistry*, 50(3), 596-602.
- Vallejos, M. E. (2006). *Aprovechamiento integral del Cannabis sativa como material de refuerzo/carga del polipropileno*. Universitat de Girona.
- Velásquez Oyarzo, Victor Hernán. (2004). *Estudio sobre consumo de drogas en jóvenes estudiantes de pregrado de la Universidad de La Frontera de Temuco*. Santiago de Chile [acceso: 10-02-2020]. Recuperado de: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/113364/cs39-velasquezv22.pdf?sequence=1>
- Vogliardi, S., Tucci, M., Stocchero, G., Ferrara, S. D., & Favretto, D. (2015). Sample preparation methods for determination of drugs of abuse in hair samples: a review. *Analytica chimica acta*, 857, 1-27.

ANEXOS



ANEXO 1

LISTA DE VERIFICACIÓN ANALISIS DE MARIHUANA EN MATRIZ PELO POR CROMATOGRAFIA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS





**LISTA DE VERIFICACIÓN ANALISIS DE MARIHUANA EN
MATRIZ PELO POR CROMATOGRAFIA GASEOSA ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

PR-UTF-

Extracción de marihuana N°:.....

Perito Confirmador:..... Fecha: Hora:.....

Técnico Laboratorio.....

Tox:.....

Muestra T:

- | | |
|--------|---------|
| 1..... | 9..... |
| 2..... | 10..... |
| 3..... | 11..... |
| 4..... | 12..... |
| 5..... | 13..... |
| 6..... | 14..... |
| 7..... | 15..... |
| 8..... | 16..... |

Controles:

- Control positivo
Blanco

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

Estándares Cerilliant:

Fecha elaboración

Nº Lote

- | | | |
|---------------------|--------|-------|
| - St. 11-NOR-THC | :..... | |
| - St. 11-NOR-THC-D3 | :..... | |
| - St. Δ 9-THC | :..... | |
| - St. Δ9-THC-D3 | :..... | |



PROCEDIMIENTO

1. Revisar correcta rotulación de muestras respecto a antecedentes periciales.
2. Medir la longitud total de la muestra de pelo, cortar 2 cm desde la raíz hacia la punta y pesar entre 130 a 150 mg de pelo (almacenar remanente) y depositar en un tubo de vidrio de 10 ml.
3. Lavar el pelo depositando en el tubo, con 8 mL de agua destilada.
4. Agitar en vortex por 1 min a 2500 r.p.m.
5. Agitar por 10 min en agitador Multi RS-60.
6. Centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m (sacar tapa al tubo y colocar parafilm antes de centrifugar).
7. Secar pelo en estufa a una temperatura entre 80 - 85°C por aproximadamente 40 min, en capsula de porcelana.
8. Lavar el pelo depositando en un nuevo tubo, con 8 mL de diclorometano.
9. Agitar en vortex por 1 min a 2500 r.p.m.
10. Agitar por 10 min en agitador Multi RS-60.

**LISTA DE VERIFICACIÓN ANALISIS DE MARIHUANA EN
MATRIZ PELO POR CROMATOGRAFIA GASEOSA ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

PR-UTF-

- | | |
|--|---|
| 11. Eliminar diclorometano. | <input type="checkbox"/> |
| 12. Repetir dos veces más desde el punto 8 a 11. | <input type="checkbox"/> |
| 13. Secar el pelo bajo corriente de nitrógeno. | <input type="checkbox"/> |
| 14. Cortar el pelo con tijeras hasta dejarlo casi polvo. | <input type="checkbox"/> |
| 15. Preparar los tubos de vidrio donde se depositarán las muestras, pesar exactamente 100 mg de pelo en el interior de este. | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| 16. Agregar 2 ml de NaOH 1 M a cada tubo. | <input type="checkbox"/> |
| 17. Agregar con micropipeta de volumen apropiado 20 μ L de una solución patrón de 10 μ g/mL de estándar interno (+)-11-nor-THC-COOH-D3 y 20 uL de estándar interno (-)- Δ^9 -THC-D3, a todos los tubos, considerando blanco y control positivo. | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| 18. Al control positivo agregar 20 μ L de solución patrón de 10 μ g/mL de (+)-11-nor-THC-COOH, y 20 uL de (-)- Δ^9 -THC, además de sobrecargar con el estándar interno correspondiente ya mencionado. | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| 19. Agitar en vortex por 30 seg a 2500 r.p.m. | <input type="checkbox"/> |
| 20. Colocar los tubos en baño María por 30 min a 80°C con una agitación de 70 U/min (revoluciones por minuto) | <input type="checkbox"/> |
| 21. Sacar tubos y dejar enfriar a temperatura ambiente. | <input type="checkbox"/> |
| 22. Extraer el Δ^9 -THC con 2,5 mL de hexano : acetato de etilo (9:1) por 5 min a 2500 r.p.m. | <input type="checkbox"/> |
| 23. Centrifugar a 2000 r.p.m por 3 min. | <input type="checkbox"/> |
| 24. Recuperar la fase orgánica (superior) en un vial ámbar de 5 mL (fracción básica). | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| 25. Repetir una vez más desde el paso 22 al 24. | <input type="checkbox"/> |
| 26. Al remanente acuoso presente en el tubo, agregar 1 mL de buffer acetato de sodio 0,1 M (pH 4,5) y 1 mL de acido acético glacial, luego medir pH hasta alcanzar el 3 - 4. | <input type="checkbox"/> |
| 27. Agitar en vortex por 30 seg a 2500 r.p.m. | <input type="checkbox"/> |
| 28. Extraer el 11-nor-THC-COOH con 2,5 mL de hexano : acetato de etilo (9:1) por 5 min a 2500 r.p.m. | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| 29. Centrifugar a 2000 por 3 min. | <input type="checkbox"/> |
| 30. Recuperar la fase orgánica (superior) en un vial ámbar de 5 mL (fracción ácida). | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| 31. Repetir una vez más desde el paso 28 al 30. | |

ANEXO 2

LISTA DE VERIFICACIÓN ANALISIS CONFIRMATORIO DE COCAÍNA EN
MATRIZ PELO POR CROMATOGRAFIA GASEOSA ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS





**LISTA DE VERIFICACIÓN ANALISIS CONFIRMATORIO DE
COCAÍNA EN MATRIZ PELO POR CROMATOGRAFIA GASEOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

RT-TOXF-C-
0001/01

N° Correlativo
LVEC-...../19

Extracción de Cocaína en Matriz Pelo N°:.....

Perito Confirmador:..... Fecha: Hora:.....

Técnico Laboratorio.....

Tox:.....
.....

Muestra T:

- | | |
|--------|---------|
| 1..... | 6..... |
| 2..... | 7..... |
| 3..... | 8..... |
| 4..... | 9..... |
| 5..... | 10..... |

Controles:

- Control positivo
- Blanco

Estándar Cerillant	Adición a muestras, Blanco y Control Positivo	Estándar Cerillant	Adición sólo a Control Positivo
Cocaína-D3		Cocaína	
Benzoilecgonina-D3		Benzoilecgonina	
6-MAM-D3		6-MAM	
Codeína-D3		Codeína	
Morfina-D3		Morfina	

PROCEDIMIENTO

- Revisar correcta rotulación de muestras respecto a antecedentes periciales.
- Medir la longitud total de la muestra de pelo, cortar 3 cm desde la raíz hacia la punta y pesar entre 130 a 150 mg de pelo (almacenar remanente) y depositar en tubo de centrifuga previamente rotulado de 15 ml. Realizar lo mismo con pelo blanco tanto como para el control positivo como para el blanco
- Lavar el pelo depositando en el tubo, con 8 mL de agua destilada.
- Agitar en vortex por 1 min a 2000 r.p.m.
- Agitar por 10 min en agitador Multi RS-60.
- Centrifugar por 1 min a 4500 r.p.m. Eliminar el remanente de agua. Luego con pinzas traspasar el pelo a una capsula de porcelana previamente rotulada.



**LISTA DE VERIFICACIÓN ANALISIS CONFIRMATORIO DE
COCAÍNA EN MATRIZ PELO POR CROMATOGRFIA GASEOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

RT-TOXF-C-
0001/01

N° Correlativo

LVEC-...../19

7. Secar pelo en estufa a una temperatura entre 85°C por aproximadamente 30 min, en capsula de porcelana.
8. Rotular nuevamente tubos de centrifuga y traspasar el pelo seco a ellos. Posteriormente lavar el pelo depositando en el tubo, con 8 ml de diclorometano (Tener cuidado con el diclorometano ya que borra los rótulos)
9. Agitar en vortex por 1 min a 2000 r.p.m.
10. Agitar por 10 min en agitador Multi RS-60.
11. Centrifugar por 1 min a 4500 R.P.M y eliminar diclorometano. Al eliminar el diclorometano se puede perder pelo, tener cuidado en este paso
12. Repetir dos veces más desde el punto 8 a 11.
13. Secar el pelo bajo corriente de nitrógeno.
14. En conos de papel previamente rotulados agregar la muestra correspondiente y proceder a cortar el pelo con tijeras hasta dejarlo como un polvo.
15. Preparar nuevos tubos de centrifuga rotulados donde se depositaran las muestras, blanco y control positivo, tomando con micropipeta de volumen apropiado 15 µL de una solución estándar de 100 µg/mL de los estándares internos Cocaína-D3, Benzoilecgonina-D3, 6-MAM-D3, Codeína-D3 y Morfina-D3. Luego evaporar bajo corriente de nitrógeno.
16. Al tubo control positivo adicionar ademas 15 µL de solución estándar de 100 µg/mL de solución estándares Cocaína, Benzoilecgonina, 6-MAM, Codeína y Morfina. Luego evaporar bajo corriente de nitrógeno.
17. Pesarse exactamente 100 mg de pelo y depositarlo en los tubos para centrifuga con los estándares sobrecargados
18. Agregar 1 ml de HCl 0,1 N a cada tubo.
19. Colocar los tubos en baño María por 18 horas, a 45°C-50°C con una agitación de 70 U/min (revoluciones por minuto)
20. Sacar cada tubo y dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar 2 ml de buffer fosfato 0,1 M pH6 y adicionar 50 µL de NaOH 1 N.
21. Agitar por 10 min en agitador Multi RS-60
22. Centrifugar por 5 min a 4500 R.P.M.



**LISTA DE VERIFICACIÓN ANALISIS CONFIRMATORIO DE
COCAÍNA EN MATRIZ PELO POR CROMATOGRFIA GASEOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

RT-TOXF-C-
0001/01

N° Correlativo

LVEC-...../19

23. Preparar la columna de extracción instalándola en el manifold y adicionando consecutivamente al vacio 2 mL de metanol y 2 mL de buffer fosfato 0,1 M pH 6.0, evitando que la columna se seque (no utilizar vacio superior a 2 mm de Hg).
24. Cargar el sobrenadante obtenido producto del proceso de digestión del pelo en el punto 22, con pipetas pasteur teniendo extremo cuidado de no tomar restos de pelo, a una razón de 1 a 2 mL/min.
25. Una vez pasadas las muestras lavar la columna adicionando consecutivamnete al vacio 2 mL de agua destilada y 0,5 mL de acido acético 0,05 M
26. Secar la columna al vacio a 15 mm de Hg por 10 min
27. Adicionar 50 µL de metanol
28. Secar la columna al vacio a 15 mm de Hg por 1 min
29. Eliminar impurezas y residuos provenientes de la matriz eluyendo la columna consecutivamente con 3 mL de hexano:acetato de etilo (80:20) y luego con 1 mL de acetina:cloroformo (50:50)
30. Aplicar un pequeño vacio para retirar el solvente ocluido en las columnas
31. Eluir las drogas básicas (cocaína, benzoilecgonina) con 3 ml de diclorometano:isopropanol:amoniac (78:20:2) y luego con 1 mL de acetato de etilo:amoniac (98:2), sin utilizar vacio. Depositar los extractos en viales de vidrio ambar de 4 mL previamente rotulados.
32. Evaporar los extractos obtenidos a sequedad bajo corriente de nitrógeno en baño termoregulado a 35 °C.
33. Derivatizar los extractos secos obtenidos, adicionando 50 µL de acetonitrilo y 50 µL de derivatizante BSTFA:TMCS 99:1.
34. Desplazar el oxígeno remanente en el tubo aplicando una pequeña corriente de nitrógeno y tapar el tubo en forma hermética.
35. Agitar a 3000 r.p.m girando el vial para arrastrar todo lo posible desde las paredes de este.

ANEXO 3

LISTA DE VERIFICACIÓN ANALISIS CONFIRMATORIO DE COCAÍNA EN
SANGRE POR CROMATOGRFIA GASEOSA ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS





**LISTA DE VERIFICACIÓN ANALISIS CONFIRMATORIO DE
COCAÍNA EN SANGRE POR CROMATOGRAFIA GASEOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

RT-TOXF-C-
0001/01

N° Correlativo

LVEC-...../19

Extracción de marihuana N°:.....

Perito Confirmador:..... Fecha: Hora:.....

Técnico Laboratorio.....

Tox:.....

.....

Muestra T:

- | | |
|--------|---------|
| 1..... | 9..... |
| 2..... | 10..... |
| 3..... | 11..... |
| 4..... | 12..... |
| 5..... | 13..... |
| 6..... | 14..... |
| 7..... | 15..... |
| 8..... | 16..... |

Controles:

Control positivo

Blanco

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

Estándares Cerilliant:

Fecha elaboración

N° Lote

- | | | |
|---------------------|--------|-------|
| - St. 11-NOR-THC | :..... | |
| - St. 11-NOR-THC-D3 | :..... | |
| - St. Δ 9-THC | :..... | |
| - St. Δ 9-THC-D3 | :..... | |

PROCEDIMIENTO

1. Revisar correcta rotulación de muestras respecto a antecedentes periciales.
2. Prepara los tubos de centrifuga donde se depositaran las muestras.
3. Tomar 30 µL de una solución estándar de 10 µg/mL de estándar interno (+)-11-nor-9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol D3 y 15 µL de estándar interno delta 9-tetrahydrocannabinol D3, y agregar a todos los tubos, considerando blanco y control positivo.
4. Al control positivo agregar 30 µL de solución estándar de 10 µg/mL de (+)-11-nor-9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol, 15 µL de 10 µg/mL de delta 9-tetrahydrocannabinol y 15 µL de 10 µg/ml de 11-OH-9-tetrahydrocannabinol. Además de sobrecargar con el estándar interno correspondiente ya mencionado.
5. Llevar a sequedad los tubos bajo corriente de nitrógeno



**LISTA DE VERIFICACIÓN ANALISIS CONFIRMATORIO DE
COCAÍNA EN SANGRE POR CROMATOGRFIA GASEOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

RT-TOXF-C-
0001/01

N° Correlativo
LVEC-...../19

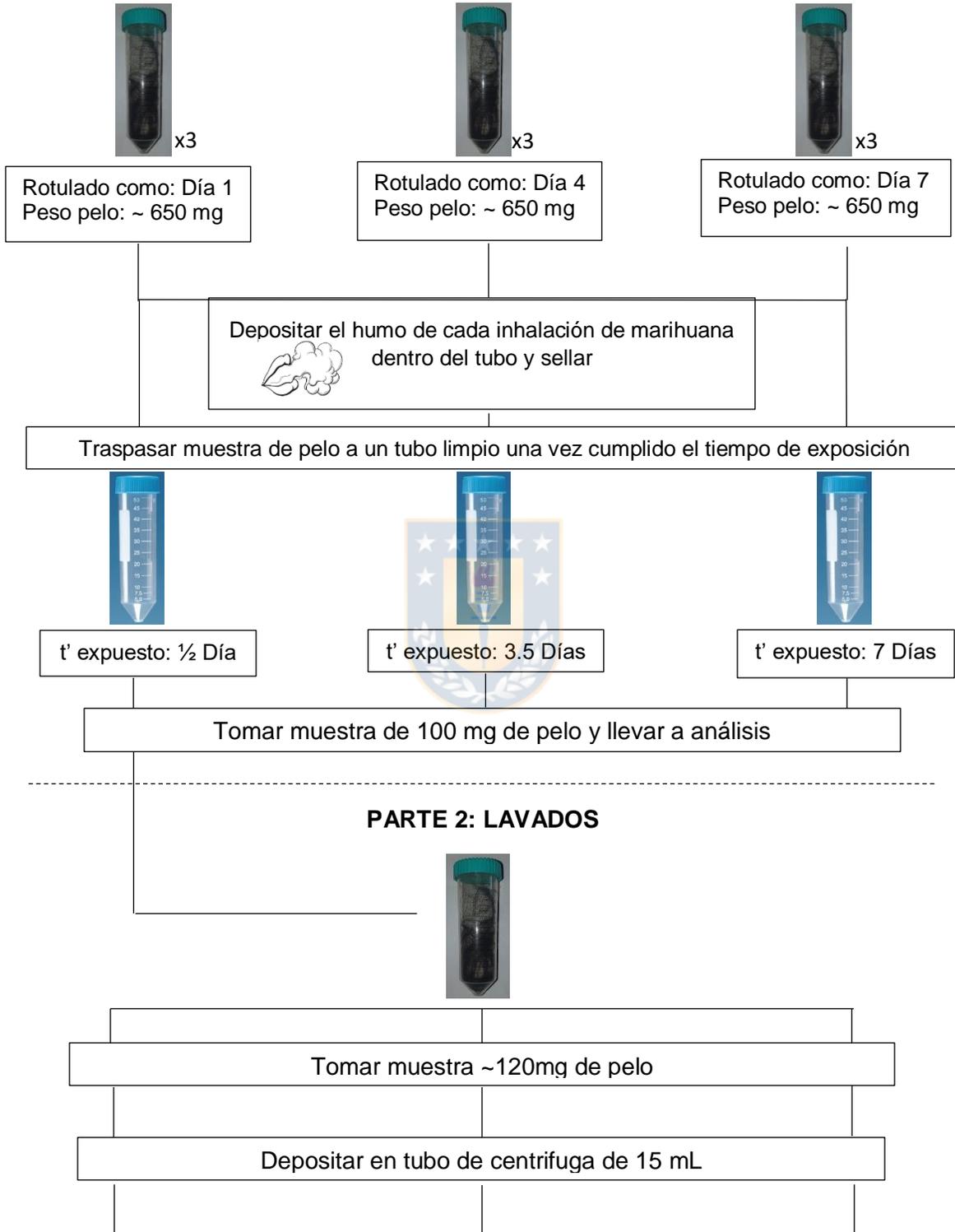
6. Depositar 3 mL de muestra de sangre correspondiente a cada tubo correctamente rotulado y 3 ml de sangre control a su correspondiente tubo.
7. Agitar cada tubo en vortex a 300 rpm por 30 segundos
8. Adicionar 6 ml de Acetonitrilo y agitar inmediatamente en vortex a 300 rpm por 2 minutos cronometrados
9. Luego centrifugar a 4400 rpm por 15 minutos
10. Proceder a extraer el sobrenadante y colectarlo en Tubos de centrifuga plásticos de 50 mL limpios
11. Agregar 10 ml de solución Ácido Acético 100 mM y agitar con vortex a 3000 rpm por 30 segundos
12. Preparar la columna de extracción instándola en el manifold y adicionando consecutivamente al vacío 2 mL de metanol y 2 mL de Solución Acido Fosforico 50 mM, evitando que la columna se seque (no utilizar vacío superior a 2 mm de Hg)
13. Cargar sobrenadante obtenido a razón de 1 a 2 mL/min.
14. Lavar la columna adicionando consecutivamente al vacío 9 ml de ácido Fosforico 50 mM y 3 mL de ácido Fosforico 50 mM / Metanol (80/20)
15. Secar la columna al vacío a 15 mm de Hg por 10 min
16. Adicionar 200 µL de hexano (no aplicar vacío)
17. Eluir las drogas acidas (+-)-11-nor-9-carboxy-delta 9 tetrahydrocannabinol con 2 mL de hexano/acetato de etilo (80/20). Depositar los extractos en viales de vidrio ambar de 4 mL.
18. Aplicar un pequeño vacío para retirar el solvente ocluido en las columnas
19. Evaporar los extractos obtenidos a sequedad bajo corriente de nitrógeno en baño termoregulado a 35°C.

ANEXO 4

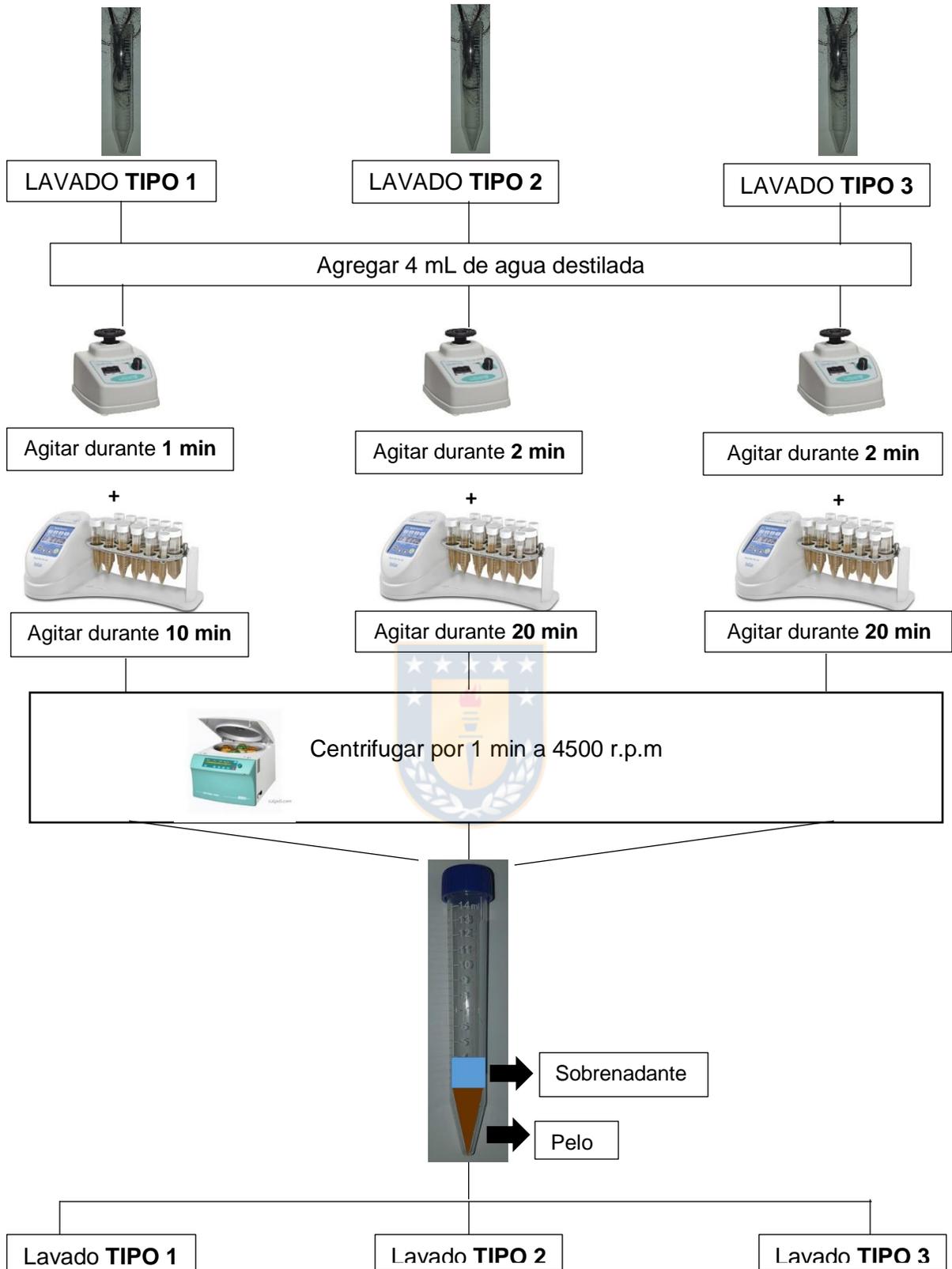
ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA 3.2.4.3 TERCERA PARTE: PRUEBAS DE CONTAMINACIÓN EXTERNA Y VARIACIONES EN EL LAVADO



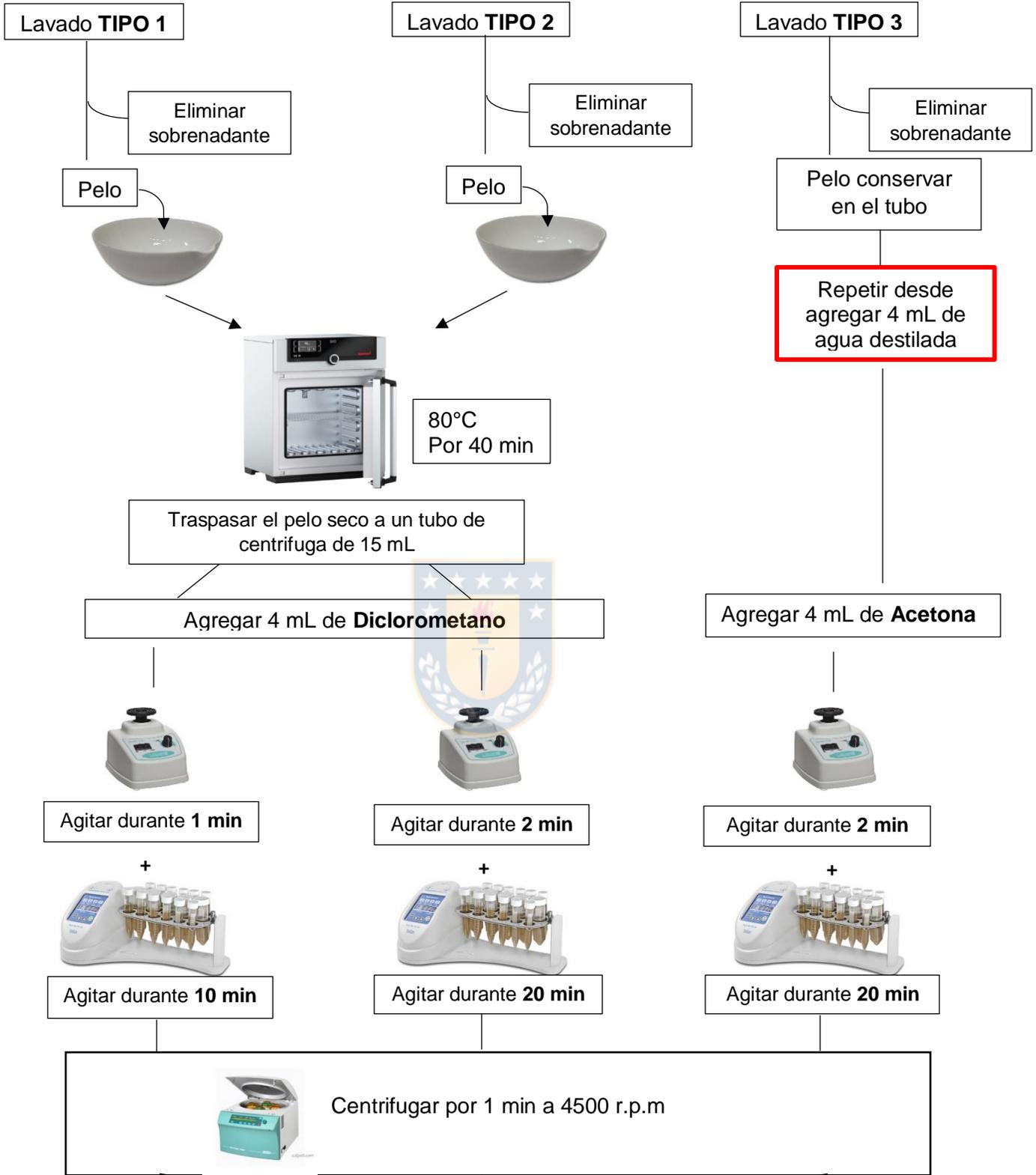
PARTE 1: CONTAMINACIÓN DE LA MATRIZ

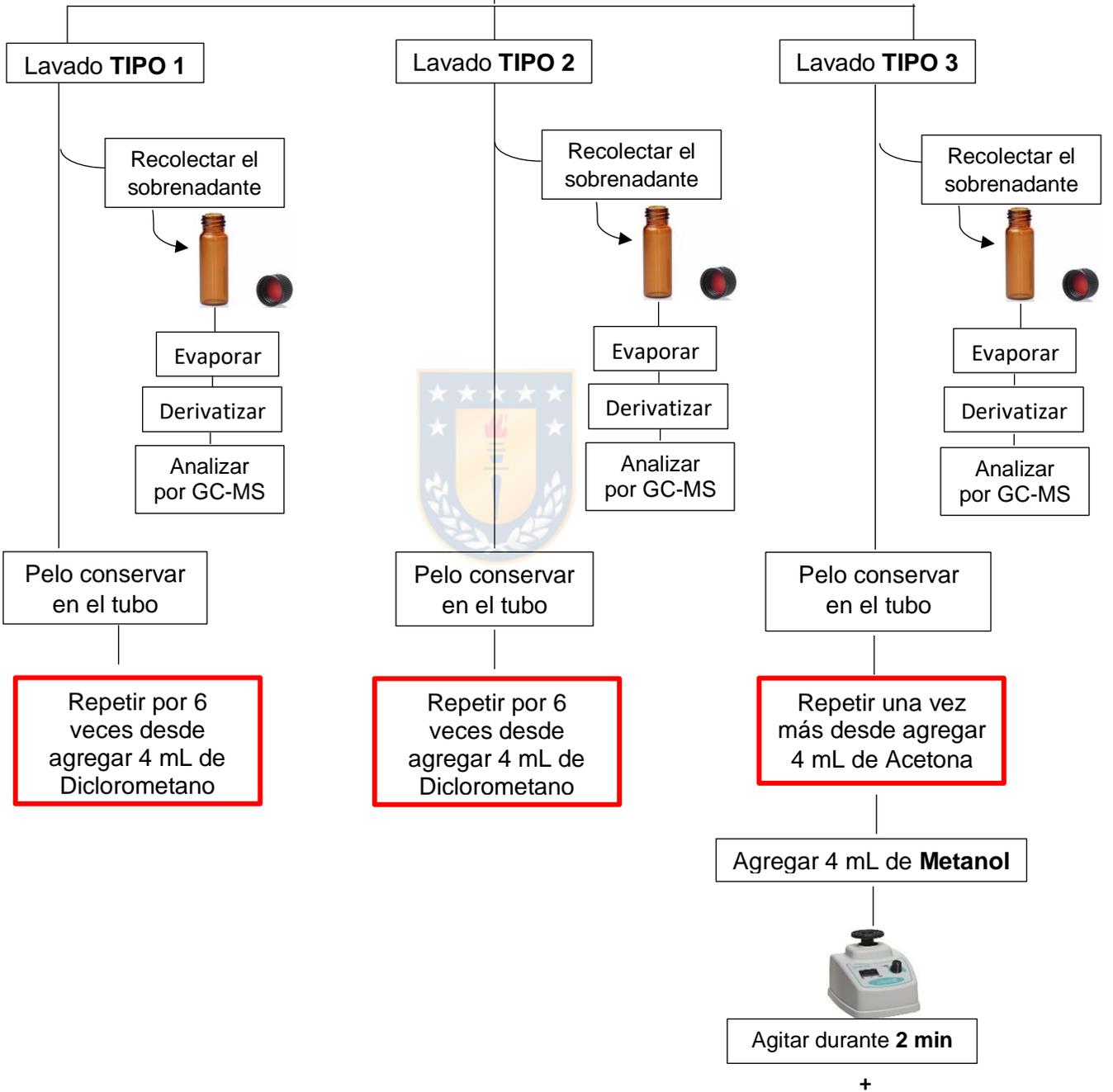
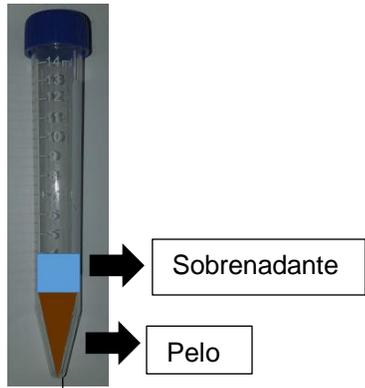


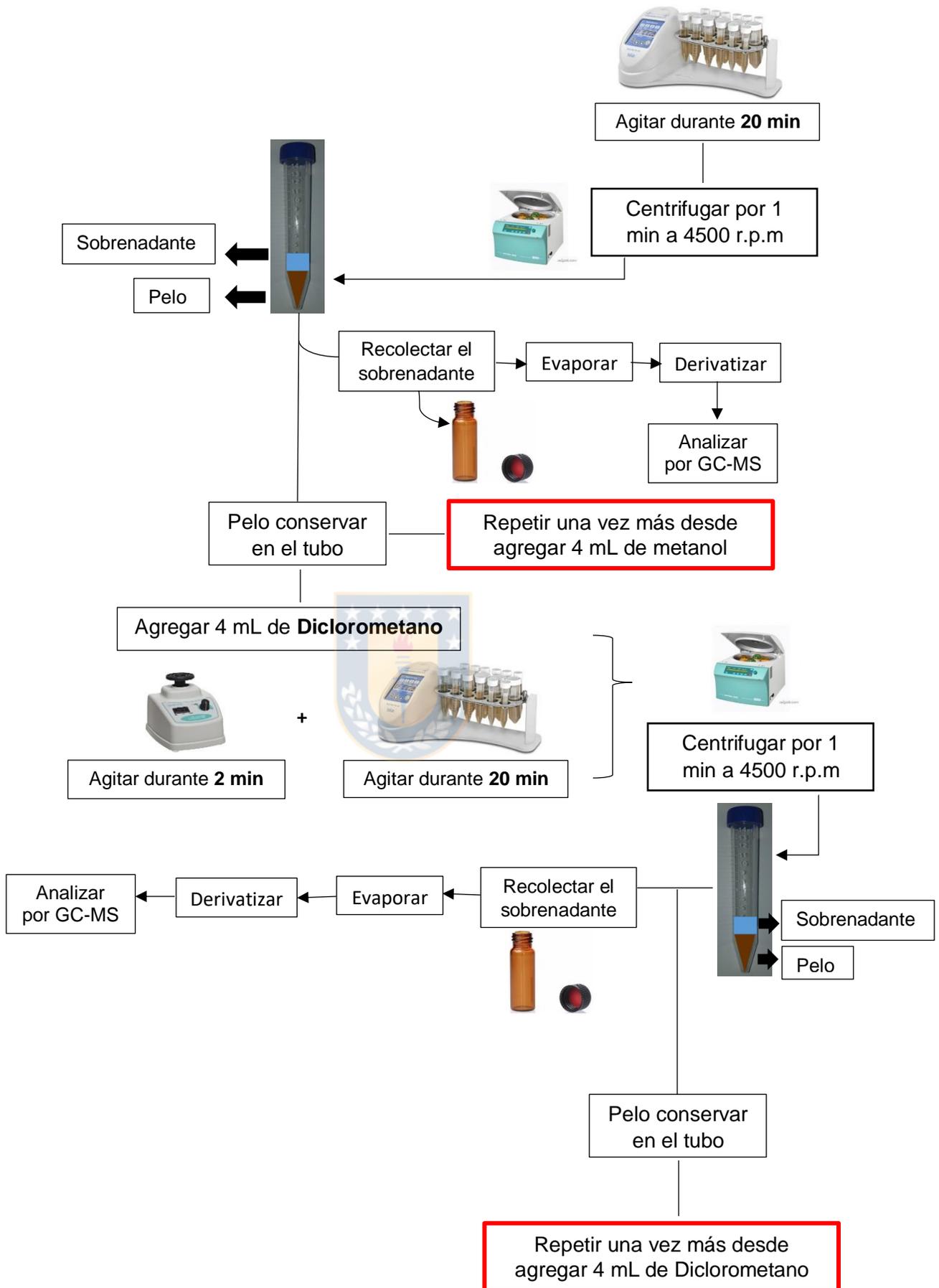
Continua



Continua







ANEXO 5

INFORMACIÓN SOBRE MODOS DE INYECCIÓN PTV Y SPLITLESS



MODO DE INYECCIÓN PTV

Corresponde a un modo de inyección a Temperatura Programada, que puede funcionar a temperatura constante o variable. La muestra se inyecta en un inserto a temperatura ambiente o subambiente que luego se calienta rápidamente con un gradiente lineal o balístico de temperatura programable permitiendo que cada compuesto evapore según su punto de ebullición a temperaturas inferiores a las que puedan causar descomposición. Además una variante consiste en mantener el inserto del inyector a una temperatura adecuada para la evaporación y purga del solvente manteniendo en el inserto los compuestos de interés de mayor punto de evaporación. Este procedimiento puede repetirse varias veces para conseguir la concentración de analitos a nivel de trazas. Tras varias inyecciones se calienta el inserto para vaporizar los compuestos de interés preconcentrados e introducirlos en la columna. Para obtener los mejores resultados la temperatura inicial de la columna se mantiene baja durante el proceso inicial de eliminación de solvente o de concentración de analitos y se calienta según el programa de temperaturas después de que el inserto alcance su temperatura máxima. (Cromlab S.L, 2015).

MODO DE INYECCIÓN SPLITLESS

Modo que consiste en una inyección sin división que es una variación de la inyección dividida y se diseñó particularmente para análisis de trazas en muestras altamente diluidas, presenta la ventajas de usar una banda de inyección estrecha a través de 'reenfoque por solvente' y 'atrapamiento en frío', discriminación de componentes de

muestra de alto punto de ebullición, y se realiza de la siguiente manera (Chemistry LibreTexts, 2019):

- Se inyecta una muestra en un inyector caliente mientras la salida dividida está cerrada.
- La muestra se evapora y es (casi) totalmente transferida a la columna.
- Después de un tiempo (el tiempo sin división) se abre el divisor.
- Cualquier muestra y vapor de disolvente presente en el divisor se ventila a través de la abertura dividida. El horno se mantiene frío durante ese tiempo.
- Después de abrir el divisor, se inicia un programa de temperatura y se inicia la separación cromatográfica real. (Chemistry LibreTexts,2019)



ANEXO 6

EJEMPLOS DE CALCULOS REALIZADOS



Cálculos para Preparación de soluciones patrón o estándar

Se prepararon una serie de diluciones en metanol a partir de los Estándares Cerilliant® Δ^9 -THC (concentración 1,0 mg/mL) y Δ^9 -THC-D₃ (concentración 100 µg/mL), obteniéndose diluciones de concentración conocida siendo para:

- Δ^9 -THC: 100 ng/µL; 10 ng/µL y 1 ng/µL
- Δ^9 -THC-D₃: 10 ng/µL

Ejemplo de cálculo:

$$[C]i \times [V]i = [C]f \times [V]f$$

[C]i: Concentración inicial

[V]i: Volumen inicial

[C]f: Concentración final

[V]f: Volumen final

Para Δ^9 -THC-D₃:

$$V_i = \frac{10 \text{ ng/ } \mu\text{L} \times 3 \text{ mL}}{100 \text{ ng/ } \mu\text{L}}$$

$$V_i = 0,3 \text{ mL} = 300 \mu\text{L}$$

Se midió el volumen de 300 µL con una micropipeta y se completó a volumen con 2700 µL de Metanol medidos igualmente con una micropipeta.

Cálculos de carga de Estándar interno para todos los tubos

La concentración de Estándar interno que deben tener los tubos de muestras es de 2ng/mg de pelo de Δ^9 -THC-D₃.

Los cálculos son de la base de 100 mg de cabello.

La Concentración del estándar interno es de 10 ng/ µL.

Entonces:

La cantidad de Volumen que se agregará a cada tubo será de 20 µL ya que:

2 ng Δ^9 -THC-D₃ → 1 mg de cabello

X → 100 mg de cabello

X = 200 ng Δ^9 -THC-D₃

200 ng Δ^9 -THC-D₃ → Y

10 ng Δ^9 -THC-D₃ → 1 μ L

Y = 20 μ L

Cálculos de carga de Estándar Δ^9 -THC

Las concentraciones en que se presenta el Estándar son:

- Δ^9 -THC: 100 ng/ μ L; 10 ng/ μ L y 1 ng/ μ L

Los cálculos son de la base de 100 mg de cabello.

Y dependiendo de la Concentración nominal así se calcula en volumen a cargar

Por ejemplo:

¿Cuál será el Volumen a cargar si se quiere una concentración nominal de 0,05 ng/mg de pelo, usando el estándar Δ^9 -THC de 1 ng/ μ L?

La cantidad de Volumen que se agregará a cada tubo será de 5 μ L ya que:

0,05 ng Δ^9 -THC → 1 mg de cabello

X → 100 mg de cabello

X = 5 ng Δ^9 -THC

5 ng Δ^9 -THC → Y

1 ng Δ^9 -THC → 1 μ L

Y = 5 μ L

Cálculo del Coeficiente de Variación

Se empleó $CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100\%$

Donde:

σ : Desviación estándar y

\bar{x} : Promedio

Ejemplo:

Para la Concentración nominal 0,05 ng/mg el promedio de las concentraciones reales obtenidas es de 0,048 ng/mg con una desviación estándar de 0,0157.

Si realizamos la operación matemática:

$$\frac{0,0157}{0,048} * 100\% = 32,70 \%$$
