



Servicio Nacional  
de **Medicina Legal**  
y **Ciencias Forenses**

**INSTRUCTIVO  
PARA LA DETERMINACIÓN DE  
PLAGUICIDAS POR  
CROMATOGRAFÍA DE CAPA  
FINA COMO MÉTODO DE  
ORIENTACIÓN/CONFIRMACIÓN.**

*Octubre, 2017*



Código: SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-01	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA COMO MÉTODO DE ORIENTACIÓN/CONFIRMACIÓN.	Versión: 1.0 Página 2 de 13
----------------------------------	--	--------------------------------

### CONTROLES

#### ELABORACIÓN DEL INSTRUCTIVO.

Fase	Nombre / cargo	Firma	Fecha
Elaborado o Modificado por:	Bqc. Catalina Carrillo		15/03/2017
	Mgs Luz Cadavid		
	Ftco. Milagros Marcano		
	Bq. Silvia Yumiseba		
PERITOS DE LA GESTIÓN TOXICOLOGÍA FORENSE			

#### APROBACIÓN METODOLÓGICA DE LA GESTIÓN ESTRATÉGICA

Fase	Nombre / cargo	Firma	Fecha
Asistencia técnica:	Ing. Alejandra Pérez M. ANALISTA DE LA UNIDAD DE PROCESOS, SERVICIOS Y CALIDAD		29/09/2017
Revisado por:	Lcdo. Christian Escobar RESPONSABLE DE LA UNIDAD DE PROCESOS, SERVICIOS Y CALIDAD		29/09/2017
Aprobado por:	Mgs. Sheldon López COORDINACIÓN GENERAL DE PLANIFICACIÓN Y GESTIÓN ESTRATÉGICA		29/09/2017

#### APROBACIÓN TÉCNICA

Nombre / Cargo	Firma	Fecha
Lcda. María Elisa Lara COORDINADORA TÉCNICA DE SERVICIOS DE MEDICINA LEGAL		30/10/2017

#### CONTROL E HISTORIAL DE CAMBIOS

Versión	Descripción del cambio	Fecha de creación/actualización
1.0	Primera versión del Instructivo para la Determinación de Plaguicidas por Cromatografía de Capa Fina como Método de Orientación/Confirmación.	15/03/2017



## ÍNDICE DE CONTENIDO

INFORMACIÓN BÁSICA.....	4
GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS.....	5
DESCRIPCIÓN DEL INSTRUCTIVO.....	7
NORMAS DE SEGURIDAD.....	11
BIBLIOGRAFÍA.....	11
ANEXOS.....	11

## ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1.....	11
--------------	----



Código: SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-01	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA COMO MÉTODO DE ORIENTACIÓN/CONFIRMACIÓN.	Versión: 1.0 Página 4 de 13
----------------------------------	---	--------------------------------

## 1. INFORMACIÓN BÁSICA.

<b>Macroproceso:</b>	<b>PERICIAS TÉCNICO CIENTÍFICAS.</b>
<b>Proceso:</b>	<b>PERICIAS TÉCNICO CIENTÍFICAS MEDICINA LEGAL.</b>
<b>Subproceso:</b>	<b>GESTIÓN PERICIAL TOXICOLOGÍA FORENSE.</b>
<b>Nombre del instructivo:</b>	<b>INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA COMO MÉTODO DE ORIENTACIÓN/CONFIRMACIÓN.</b>
<b>Código del instructivo:</b>	<b>SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-01.</b>
<b>Descripción:</b>	<p><b>PROPÓSITO:</b></p> <p>Estandarizar la determinación de plaguicidas: organofosforados, organoclorados, organonitrogenados, carbamatos, piretroides, piretrinas, cumarínicos y derivados amoniacales por cromatografía de capa fina, como método de orientación y confirmación.</p> <p><b>ALCANCE:</b></p> <p>Se aplica en muestras biológicas (sangre, suero, contenido gástrico, vómito y vísceras) y no biológicas (alimentos, bebidas, medicamentos, entre otros.) relacionados con el hecho de interés criminalístico.</p>
<b>Responsable:</b>	Jefe de la gestión pericial y peritos acreditados de la Gestión de Toxicología Forense del Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.
<b>Marco Legal:</b>	<p><b>1. CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR.</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>➤ <b>Art. 195.</b> La Fiscalía General del Estado.</li><li>➤ <b>Art. 233.</b> Deberes de servidores públicos.</li></ul> <p><b>2. CÓDIGO ORGÁNICO INTEGRAL PENAL.</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>➤ <b>Art. 292.</b> Alteración de evidencias y elementos de prueba.</li><li>➤ <b>Art.448.</b> Organización y Dirección.</li><li>➤ <b>Art. 449.</b> Atribuciones. Numerales 8 y 9.</li><li>➤ <b>Art. 456.</b> Cadena de Custodia.</li><li>➤ <b>Art. 458.</b></li></ul>



**Lineamientos:**

- Preservación de la escena del hecho o indicios
- **Art. 459.**  
Actuaciones y Técnicas Especiales de Investigación, Numeral 1.
  - **Art. 463.**  
Obtención de muestras.
  - **Art. 498.**  
Medios de prueba.
  - **Art. 511.**  
Reglas Generales.
3. **DECRETO EJECUTIVO N°759.** Reglamento de Coordinación Interinstitucional para la Organización, Dirección, Administración y Operación del Sistema Especializado Integral de Investigación, Medicina Legal y Ciencias Forenses.
- **Art.13**  
Director General del Servicio Nacional de medicina legal y Ciencias Forenses, **numeral:** 5
  - **Art. 14.**  
Atribuciones del Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, **numeral:** 1, 2, 4,5.
4. **RESOLUCIÓN N° 040-2014.** Reglamento del Sistema Pericial Integral de la Función Judicial.
- **Capítulos:** 2, 3,4 y 5.
5. **RESOLUCIÓN N°073-FGE-2014.** Suplemento del Registro Oficial 318,25-VIII-2014.
- **Acápites:** Manual de Química y Toxicología Forense.
- 
- El instructivo es "RESTRINGIDO" y de uso exclusivo del Laboratorio de Criminalística y Ciencias Forenses de Pichincha-Quito en su gestión interna Toxicología Forense.
  - El instructivo es de "USO OBLIGATORIO" para el personal de la gestión interna Toxicología Forense.
  - Es responsabilidad del Jefe de la gestión interna Toxicología Forense garantizar la aplicación y el cumplimiento del presente instructivo.
  - Se prohíbe la reproducción total o parcial del instructivo sin autorización expresa.

## 2. GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS.

### 2.1. GLOSARIO DE TÉRMINOS.

- **Carbamatos:** plaguicida de acción análoga a los compuestos Organofosforados (OP) al causar una disminución de la actividad de la colinesterasa, pero la unión al sitio activo de la enzima colinesterasa es



Código: SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-01	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA COMO MÉTODO DE ORIENTACIÓN/CONFIRMACIÓN.	Versión: 1.0
		Página 6 de 13

reversible. Consecuentemente, aunque los síntomas son prácticamente idénticos a los del envenenamiento por OP, tienen una duración específica. (Jickells, 2008).

- **Cromatografía de Capa Fina:** "método separativo y permite al mismo tiempo un análisis cualitativo. En general, se aplica a posteriori de alguna forma de pre tratamiento de la muestra, como por ejemplo, extracción de analitos de la muestra con solventes" (Fiorenza, 2007).
- **Cumarínicos:** "sustancias derivadas de la 4-hidroxi-cumarina (anticoagulantes de primera generación) y la indano-1,3-diona (anticoagulantes de segunda generación o superwarfarínicos). Estas sustancias inhiben la coagulación de la sangre por interferencia de la síntesis de factores de coagulación vitamina K- dependientes" (Jickells, 2008).
- **Derivados Amoniacales:** son los herbicidas más importantes desde el punto de vista clínico. Fueron desarrollados en base a los efectos fitotóxicos de los derivados de amonio cuaternario. Son compuestos alcalinos, sólidos cristalinos, solubles en agua. Los principales son: Paraquat, Diquat, Morfamquat, Cloromequat, Mepiquat, Difenzoquat. (Vargas, 2001).
- **Muestra biológica:** "espécimen sobre el cual se realizará el análisis toxicológico de rutina, cuya adquisición, almacenamiento y transporte al laboratorio se han documentado adecuadamente para garantizar la debida cadena de custodia" (Jickells, 2008).
- **Órganoclorado:** "hidrocarburos clorados de diversas estructuras. Estos compuestos fueron usados como insecticidas en muchos países. Son muy persistentes en el medio ambiente" (Jickells, 2008).
- **Órganofosforado:** "grupo de plaguicidas, se usan en agricultura principalmente para el control de insectos de cuerpo blando y su toxicidad para los seres humanos varía según el compuesto" (Fiorenza, 2007).
- **Órganonitrogenado:** grupo de pesticidas, los cuales se caracterizan por contener un átomo de Nitrógeno en su estructura.
- **Piretrinas:** componentes insecticidas presentes en extractos de las flores de *Pirethrum cinerariaefolium* y otras especies. Las piretrinas comprenden ésteres de estereoisómeros naturales de ácido crisantémico (piretrina I, cinerina I y jasmolina I) y los correspondientes ésteres de ácido piretrico (piretrina II, cinerina II y jasmolina II). (Jickells, 2008).
- **Piretroides:** análogos sintéticos de las Piretrinas, que son altamente tóxicos para los insectos. Las piretrinas y piretroides tienen una toxicidad relativamente baja para los seres humanos, pero la exposición a los mismos por inhalación puede causar reacciones localizadas en el tracto respiratorio superior e inferior, lo que provoca edema oral y laríngeo, tos, dificultad para respirar y dolor de pecho. (Jickells, 2008).
- **Pruebas cualitativas:** "reacciones químicas orientativas de color y precipitación que indican la posible presencia de la sustancia que se pretende identificar con el análisis, estas cubren un número importante de drogas y otros tóxicos" (Skoog, 1992).



## 2.2. ABREVIATURAS.

- **CCF:** Cromatografía de Capa Fina.
- **Conc:** Concentrado.
- **N/A:** No aplica.
- **SNMLCF:** Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.

## 3. DESCRIPCIÓN DEL INSTRUCTIVO.

### 3.1. FUNDAMENTO TEÓRICO.

El término "plaguicida" abarca una amplia variedad de sustancias utilizadas para destruir formas de vida no deseadas. Más de mil plaguicidas están disponibles y se utilizan ampliamente en la actualidad. Estos juegan un papel importante en la toxicología clínica y forense como causas de intoxicaciones suicidas, homicidas y accidentales. (Jickells, 2008).

El Laboratorio de Toxicología Forense del Departamento de Criminalística de Pichincha, se encarga de la determinación de un número significativo de estos, tales como: Órganofosforados, Órganonitrogenados, Órganoclorados, Cumarínicos, Piretroides, Piretrinas y Derivados amoniacales. Para lograrlo, entre las técnicas utilizadas se emplea la Cromatografía de Capa fina que es ampliamente utilizada para la separación y la identificación de fármacos, drogas, plaguicidas, etc. Es igualmente aplicable, a los medicamentos en estado puro, extraídos de formulaciones farmacéuticas, materiales manipulados ilícitamente, y muestras.

En su forma más simple, la Cromatografía de Capa Fina puede considerarse como la separación de las sustancias en una superficie revestida con una fase estacionaria. La fase móvil se mueve a través de la superficie plana de un borde a otro y se produce la separación de las sustancias según su afinidad a la fase estacionaria y a la fase móvil.

La visualización de la placa cromatográfica se realiza roseando la misma con un reactivo el cual va a interactuar con grupos funcionales específicos presentes en la molécula. (Fiorenza, 2007)

### 3.2. EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y CONDICIONES AMBIENTALES.

#### 3.2.1. EQUIPOS:

- Agitador magnético;
- Estufa;
- Sorbona;
- Sistema de revelado: Nebulizador y bomba de vacío
- Cabina de UV; y,
- Equipo de destilación.

Código: SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-01	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA COMO MÉTODO DE ORIENTACIÓN/CONFIRMACIÓN.	Versión: 1.0 Página 8 de 13
----------------------------------	--	--------------------------------

### 3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO:

- Embudos de extracción o Erlenmeyer;
- Capilares reducidos en diámetro por estiramiento al calor;
- Papel de filtro;
- Placas cromatográficas: Especificaciones: Sílica Gel, 20 x 20 cm., F-254, 200 um;
- Cubas cromatográfica;
- Embudos de filtración;
- Pipetas: serológicas y pasteur;
- Vasos de precipitación;
- Papel ph;
- Tubos de ensayo; y,
- Espátula.

### 3.2.3. REACTIVOS Y ESTÁNDARES DE REFERENCIA:

#### 3.2.3.1. REACTIVOS.

- Éter etílico;
- Sulfato de sodio anhidro;
- Eluyente: Hexano – Acetona (4:1);
- Éter de petróleo;
- 50 ml de solución saturada de Cloruro Mercuríco;
- Yoduro de Potasio sólido;
- Solución de Hidróxido de Sodio al 40%;
- Alcohol etílico 95°;
- Hidróxido de Amonio acuoso 2 mol/litro; y,
- Reveladores:
  - ✓ Para fosforados: Cloruro de Paladio 0,5 % en HCl 10%.
  - ✓ Para clorados: Nitrato de plata 1% acuoso.
  - ✓ Para Carbamatos: Vainillina 1% en ácido sulfúricos conc.
  - ✓ Para cumarínicos: ácido sulfúrico al 5%.
  - ✓ Para derivados amoniacales: Reactivo de NESSLER.
  - ✓ Para Diquat y Paraquat: Ditionito de Sodio sólido.

#### 3.2.3.2. ESTÁNDARES/PATRÓN:

- Para fosforados: Acefate y Malathion;
- Para Organoclorados: Estándar de Referencia Organochlorine Pesticide Mix AB #1;
- Para Carbamatos: Estándar de Referencia Carbamate Pesticide Calibration Mixture marca RESTEK;
- Para cumarínicos: Brodifacoum y Warfarina; y,
- Para piretroides: Estándar de Referencia Pyrethroid Standard Mixture marca SIGMA – ALDRICH.



#### 3.2.4. MATERIALES VARIOS:

- Guantes desechables; y,
- Papel absorbente.

#### 3.2.5. CONDICIONES AMBIENTALES:

- Ver: Instructivo para el control de temperatura.

### 3.3. MANEJO DE INDICIOS Y MUESTRAS:

#### 3.3.1. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO:

- Ver: Instructivo para Transporte, Almacenamiento y Conservación de Indicios.

#### 3.3.2. PREPARACIÓN. Y MANIPULACIÓN:

- Ver: Protocolo de Toma, Conservación y Recepción de Muestras Biológicas para Análisis Toxicológicos.

### 3.4. PROCEDIMIENTO:

El procedimiento considerado para el desarrollo de este ensayo, debe obedecer a las siguientes fases y estipulaciones:

#### 3.4.1. EXAMEN FÍSICO DE LAS MUESTRAS.

- Verificar las características organolépticas de la muestra.
- Medir el pH (aplicable únicamente para contenido gástrico).

*Nota Técnica:* En el caso de hallarse material no digerido, examinar por separado.

#### 3.4.2. EXTRACCIÓN DE PLAGUICIDAS ORGÁNICOS FIJOS.

- Tomar de 10 a 50 ml o 5 gr de muestra.
- Añadir 20 ml de éter etílico en un recipiente extractor (embudo de separación o ERLLENMEYER).
- Agitar (en forma manual o con agitador magnético) y dejar en contacto con el solvente hasta el día siguiente.
- Separar la capa etérea, filtrando por sulfato de sodio anhidro.

*Nota Técnica:* separar el filtrado en dos vasos para su debido análisis confirmatorio por GC-MS.

- Evaporar.
- Enfriar, re disolver el residuo en 0.5 ml de éter etílico.



Código: SNMLCF-ML- TOXICOLOGÍA-01	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA COMO MÉTODO DE ORIENTACIÓN/CONFIRMACIÓN.	Versión: 1.0
		Página 10 de 13

- Sembrar en la placa cromatografica la muestra conjuntamente con estándares del correspondiente plaguicida (una placa por grupo químico: Órganoclorados, Órganofosforados, Carbamatos, Cumarínicos y Piretroides, etc.) disueltos en éter etílico.
- Colocar la cuba cromatográfica con el eluyente y correr con un frente de 10 cm.
- Sacar de la cámara y dejar secar la placa a temperatura ambiente. Observar bajo la luz UV y luego revelar con el reactivo correspondiente.

**Nota Técnica:** para el revelado de la placa cromatográfica se debe rociar el reactivo con la bomba de presión sobre la placa, a una distancia aproximada de 15 cm, de arriba hacia abajo máximo dos veces.

### 3.4.3. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS DERIVADOS DE BIPERIDILO (AMONIO CUATERNARIO).

#### 3.4.3.1. EXTRACCIÓN.

- Añadir 20 ml de alcohol etílico a 20 ml de contenido estomacal.
- Agitar y dejar en reposo en un recipiente con tapa o Erlenmeyer.
- Destilar y recoger los primeros ml (3 ml) en tubo de ensayo, transcurridos los primeros 20 minutos.

#### 3.4.3.2. DETERMINACIÓN.

- Añadir gotas de reactivo de NESSLER a 1 ml de destilado.

**Nota Técnica:** la composición y preparación del reactivo NESSLER se halla en el acápite de Anexos, como Anexo N°6.1.

### 3.4.4. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE DIQUAT – PARAQUAT.

#### 3.4.4.1. EXTRACCIÓN.

- Añadir 0,5 ml de Hidróxido de Amonio a 1 ml de muestra.
- Mezclar por 5 minutos.

#### 3.4.4.2. DETERMINACIÓN.

- Añadir 20 mg. de Ditionito de Sodio sólido con la espátula.



### 3.5. MÉTODO DE CÁLCULO:

N/A

3.6. RESULTADOS Y ANÁLISIS: la determinación de resultados será estipulada en función de la siguiente tabla:

**TABLA 1**  
**COLORACIÓN DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA**

GRUPO DE PLAGUICIDA	REVELADOR	COLORACIÓN
ÓRGANOCOLORADOS	Solución acuosa de Nitrato de Plata 0,25 N	Manchas de color gris
ÓRGANOFOSFORADOS	Cloruro de paladio 0,5 % en HCl 10%	Manchas de color amarillo y/o café
CARBAMATOS	Vainillina al 1% en ácido sulfúrico Conc.	Manchas de color rosado intenso
CUMARÍNICOS	Ácido sulfúrico 5% + calor 60°C	Manchas de color café
PIRETRINAS PIRETROIDES	Observar bajo la luz UV	Manchas de color verde
DERIVADOS AMONIACALES	Reactivo de Nessler	Precipitado de color rojo ladrillo
DIQUAT / PARAQUAT	Ditionito de Sodio sólido	Fuerte color azul a negro = PARACUAT Amarillo verdoso = DICUAT

(Vallejo, S/A)

### 4. NORMAS DE SEGURIDAD.

Considere lo estipulado en la Resolución N°073-FGE-2014. Suplemento del Registro Oficial 318,25-VIII-2014, acápite: Manual de Bioseguridad.

### 5. BIBLIOGRAFÍA.

- Fiorenza, G. y. (2007). Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos para Laboratorios de Baja Complejidad. manual. Buenos Aires, Argentina.
- Jickells, S. y. (2008). Clarke's Analytical Forensic Toxicology. Londres: Pharmaceutical Press.
- Skoog, D. y. (1992). Principios de Análisis Instrumental.
- Vargas, B. (2001). Cátedra de Toxicología Clínica y Toxicología II. Quito.
- Vallejo, M. (S/A). Toxicología Analítica. Bogotá: Universidad Nacional.



Código: SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-01	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA COMO MÉTODO DE ORIENTACIÓN/CONFIRMACIÓN.	Versión: 1.0 Página 12 de 13
----------------------------------	---	---------------------------------

## 6. ANEXOS.

6.1. **PREPARACIÓN DEL REACTIVO NESSLER:** para la preparación de este reactivo considere lo siguiente:

- Añadir a continuación un volumen igual de una solución de Hidróxido de Sodio al 40% recién preparada.
- Añadir yoduro de potasio sólido a 50 ml de solución saturada de cloruro mercúrico, hasta que aparezca el precipitado de color rojo.



**TRAZABILIDAD DEL DOCUMENTO, COPIAS Y COMPULSAS.**

<b>No. de Versión</b>	<b>No. de Copias Distribuidas</b>	<b>Nombre de la persona que recibe</b>	<b>Firma</b>	<b>Fecha</b>	<b>Firma del SGC - Devolución</b>

