



Servicio Nacional
de Medicina Legal
y Ciencias Forenses

**INSTRUCTIVO PARA LA
DETERMINACIÓN DE
CANNABINOLES EN MUESTRAS
BIOLÓGICAS MEDIANTE
INMUNOENSAYO Y
CROMATOGRAFÍA DE CAPA
FINA.**

Octubre, 2017



CONTROLES

ELABORACIÓN DEL INSTRUCTIVO.

FASE	Nombre / Cargo	Firma	Fecha
Elaborado o Modificado por:	BQC. Catalina Carrillo		21/06/2017
	Microbióloga Luz Cadavid		
	BQ. Silvia Yumiseba		
	PERITOS DE LA GESTIÓN TOXICOLOGÍA FORENSE		

APROBACIÓN METODOLOGICA 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 COORDINADOR GENERAL DE PLANIFICACIÓN Y GESTIÓN ESTRATÉGICA		29/09/2017

APROBACIÓN DEL INSTRUCTIVO.

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

CONTROL E HISTORIAL DE CAMBIOS

Versión	Descripción del cambio	Fecha de creación/actualización
1.0	Primer versión del Instructivo para la determinación de Cannabinos en Muestras Biológicas mediante Inmunoensayo y Cromatografía de Capa fina.	21/06/2017



ÍNDICE DE CONTENIDO

INFORMACIÓN BÁSICA	4
GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS.....	5
DESCRIPCIÓN DEL INSTRUCTIVO.....	6
NORMAS DE SEGURIDAD.....	11
BIBLIOGRAFÍA.....	11
ANEXOS.....	11

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.

ILUSTRACIÓN 1	10
---------------------	----



1. INFORMACIÓN BÁSICA

Macroproceso:	PERICIAS TÉCNICO CIENTÍFICAS
Proceso:	PERICIAS TÉCNICO CIENTÍFICAS MEDICINA LEGAL
Subproceso:	GESTIÓN PERICIAL TOXICOLOGÍA FORENSE
Nombre del instructivo:	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE CANNABINOLES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS, MEDIANTE INMUNOENSAYO Y CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA.
Código del instructivo:	SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-11
Descripción:	<p>PROPÓSITO:</p> <p>Estandarizar la determinación de cannabinoles en muestras biológicas, mediante inmunoensayos y cromatografía de capa fina.</p> <p>ALCANCE:</p> <p>Se aplica en muestras biológicas (sangre, suero sanguíneo, orina contenido gástrico) y sustancias sospechosas de causar intoxicación (medicamentos, bebidas, alimentos, extractos de plantas, plantas, entre otras) relacionados con el hecho de interés criminalístico.</p>
Responsable:	Jefe de la gestión pericial y peritos acreditados de la Gestión de Toxicología Forense del Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.
Marco Legal:	<p>1. CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR.</p> <ul style="list-style-type: none">➤ Art. 195. La Fiscalía General del Estado.➤ Art. 233. Deberes de servidores públicos <p>2. CÓDIGO ORGÁNICO INTEGRAL PENAL.</p> <ul style="list-style-type: none">➤ Art. 292. Alteración de evidencias y elementos de prueba➤ Art.448. Organización y Dirección➤ Art. 449. Atribuciones. Numerales 8 y 9.➤ Art. 456. Cadena de Custodia.➤ Art. 458. Preservación de la escena del hecho o indicios

Lineamientos:

- **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 Toxicología Forense.
 - El instructivo es de "USO OBLIGATORIO" para el personal de la Gestión de Toxicología.
 - Es responsabilidad del Jefe de la Gestión de Toxicología Forense garantizar la aplicación y el cumplimiento del presente instructivo.
 - Se prohíbe reproducción total o parcial del instructivo sin autorización expresa.

2. GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS.

2.1. GLOSARIO DE TÉRMINOS.



- **Cannabinoides:** compuesto orgánico perteneciente al grupo de los terpenofenoles, activa los receptores cannabinoides en el organismo humano. La forma plural **cannabinoides** originalmente aludía al particular grupo de metabolitos secundarios encontrados en la planta de cannabis, responsable de los efectos farmacológicos característicos de la planta. (Vargas, 2001)
- **Sustancia sospechosa:** "sustancia relacionada causantes de la intoxicación y puede ser: cigarrillos, cenizas, líquidos, bebidas alcohólicas, extractos de plantas, vegetales, etc."(Vargas, 2001)
- **Screening:** "ensayos o análisis simples dirigidos a detectar en una muestra la presencia de los tóxicos más probables". (Repetto M. , 2016)

2.2. ABREVIATURAS.

- **GC-MS.** : Cromatografía de Gases- Masas.
- **CCF** : Cromatografía de Capa Fina
- **p.a.** : Principio activo
- **Rf** : Factor de Retención
- **SNC** : Sistema Nervioso Central
- **SNMLCF** : Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses
- **THC** : Tetrahidrocannabinol

3. DESCRIPCIÓN DEL INSTRUCTIVO.

3.1. FUNDAMENTO TEORICO

Desde tiempos inmemoriales de la historia, todas las sociedades han utilizado drogas que actúan sobre: el humor, el pensamiento y los sentimientos. En tiempos actuales, todas las civilizaciones han buscado alivio en medicamentos: analgésicos, sedantes, tranquilizantes, estimulantes, hipnóticos, narcóticos, etc. La mayoría de los cuales actúan sobre el S.N.C., estimulando o inhibiéndolo.

Por otra parte, existen sustancias con características químicas que al ingresar al organismo pueden alterar la percepción sensorial del individuo, generando alucinaciones e interferencia en el estado de ánimo y facultades cognitivas. Son sustancias en su mayoría de origen vegetal, entre estos tenemos al peyote, hongos, ayahuasca, escopolamina, marihuana, entre otros.

La marihuana es de origen oriental, pero actualmente se encuentra difundido por todo el mundo, su actividad farmacológica depende del contenido del p.a. delta-9-tetrahidrocannabinol THC que está en mayor concentración en el exudado resinoso de las sumidades floridas de las plantas femeninas. (Vargas, 2001).

Los inmunoensayos han sido utilizados como métodos rutinarios para el análisis de drogas en fluidos biológicos y otras matrices. Todos los inmunoensayos están basados en la interacción de una molécula objetivo

(antígeno) con su correspondiente anticuerpo. Las técnicas de inmunoensayos usan un anticuerpo específico para la clase de droga o fármaco que se está ensayando, y una forma marcada de la misma droga o una forma marcada del anticuerpo para generar una señal medible. (Jickells S. y., 2008).

La Cromatografía de Capa Fina es un método ampliamente utilizado, sencillo y requiere de una infraestructura mínima. Puede ser un poderoso método separativo y permite al mismo tiempo un análisis cualitativo. La CCF es la base del procedimiento para el aislamiento e identificación de múltiples sustancias luego de la extracción de las mismas y/o metabolitos presentes con solventes adecuados: sangre, contenido estomacal, vísceras, residuos en la escena, comprimidos o formulaciones. Esta metodología es recomendada para la identificación de varios compuestos y puede llegar a utilizarse como técnica semicuantitativa. (Flanagan, 1995).

3.2. EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y CONDICIONES AMBIENTALES.

3.2.1. EQUIPOS:

- Sorbona;
- Plancha térmica;
- Centrifuga;
- Cuba cromatográfica; y,
- Lámpara UV.

3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO:

- Embudos de separación;
- Erlenmeyer;
- Vasos de precipitación 80 ml;
- Embudos de filtración;
- Papel filtro; y,
- Capilares reducidos en diámetro por estiramiento al calor.

3.2.3. REACTIVOS Y ESTÁNDARES DE REFERENCIA:

3.2.3.1. REACTIVOS.

- Hidróxido de sodio 10 N;
- Ácido clorhídrico concentrado
- N- Hexano;
- Acetato de etilo;
- Sulfato de sodio anhidro;
- Amoniaco;
- Eluente de elección:
 - ✓ Acetato de etilo: 12 / Metanol: 5 / Amoniaco: 1 / Agua: 0.5



- Eluentes alternativos o de confirmación:
 - ✓ Cloroformo: 70 / Metanol: 30 / Amoniaco 2 ó
 - ✓ Tolueno en cámara abierta

3.2.3.2. ESTÁNDARES/PATRÓN:

- Cannabinos disponibles en el laboratorio.
- Extracto de la planta de marihuana.

3.2.3.3. OTROS:

- Placas de Silica gel G60 con aditivo F 254;y,
- Screening de drogas.
- Papel pH

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. SCREENING INMUNOLÓGICO DE DROGAS DE ABUSO.

- Verificar que la muestra biológica a investigar se encuentre a temperatura ambiente.
- Remover el empaque que contiene el panel de drogas.
- Introducir el panel en el frasco que contiene la muestra, de modo que la misma suba por capilaridad (tarda aproximadamente 20 segundos).

- Esperar de 1-2 minutos para leer la coloración presentada y compararla con el control de modo de verificar si en la muestra existe algún adulterante.
- Esperar de 4-5 minutos y observar el apareamiento de bandas de color rojo.
- En caso positivo confirmar por métodos cromatográficos.

3.4.1.1. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.

3.4.1.1.1. Extracción Líquido – Líquido.

Una vez realizado el screening de drogas de abuso si se obtuvo un resultado preliminar de CANNABINOLES positivo, se procederá a realizar hidrólisis y posteriormente una purificación de la muestra, como se describe a continuación:

3.4.1.1.2. Hidrólisis/purificación

- A 20 ml. de orina o 2-5 ml. de sangre contenidos en un erlenmeyer de 250 ml. añadir 2 ml. de Hidróxido de sodio 10 N, llevar a B.M. 50 °C con agitación ocasional durante 20 minutos.
- Enfriar y ajustar el pH a 2 con ácido clorhídrico concentrado (verificar mediante papel pH)
- Adicionar 15 ml. de solvente de extracción (n-hexano: acetato de etilo 7:1)
- Extractar mediante agitación mecánica por 10 min y poner tapón.
- Dejar reposar al menos 24 horas.
- Separar la capa orgánica (de ser necesario con ayuda de centrifugación).
- Filtrar el extracto por sulfato de sodio anhidro, lavar el filtro con 5 ml. de solvente y evaporar a sequedad a temperatura ambiente.
- Reservar el extracto obtenido para la cromatografía.

Nota Técnica: en caso de obtener un resultado positivo en el screening de drogas, si se dispone muestra suficiente, realizar dos extracciones, o en su defecto, separar el filtrado en dos vasos para su debido análisis confirmatorio por GC-MS.

- Evaporar a sequedad en la plancha térmica.
- Re - disolver el extracto con 0.2 ml. de etanol para análisis en CCF.



3.4.1.1.3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF).

- Realizar la siembra en la placa cromatográfica con la ayuda de un capilar, alternadamente sembrar estándares conocidos para comparación.
- Colocar en la cámara cromatografía que contenga el eluente de elección con saturación previa de 30 min. antes y correr la cromatografía en un frente de 10 cm.
- Sacar de la cámara.
- Secar bajo Sorbona.
- Observar bajo Luz UV y observar fluorescencia
- Identificar por comparación con los RFs del estándar.

3.5. MÉTODO DE CÁLCULO:

N/A

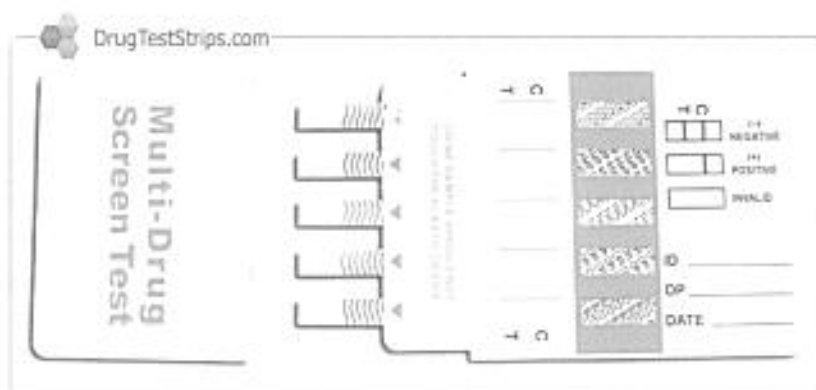
3.6. RESULTADOS Y ANÁLISIS:

La determinación de resultados será estipulada en función de lo siguiente:

3.6.1. SCREENING DE DROGAS.

- En caso negativo aparecerán bandas de color rojo tanto en la zona del Control y del Testigo
- En caso positivo aparecerá una banda de color rojo en la zona del área del Control.
- En el caso de que no aparezcan bandas de color rojo en las zonas del Control y del Testigo, la prueba se considerará Inválida.

ILUSTRACIÓN 1
TEST SCREENING DE DROGAS



(Royero Distribuidora, 2013)

3.6.2. RESULTADOS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.

Al ser pruebas de TIPO CUALITATIVO se reportará como POSITIVO o NO DETECTADO, para lo cual se deberá comparar los estándares con las muestras bajo Luz UV, observando su fluorescencia.

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.

- Jickells, S. (2008). Clarke's Analytical Forensic Toxicology. Chicago: Pharmaceutical Press.
- Repetto, M. (2016). Experto Internacional en Toxicología. Glosario de Términos usados en Toxicología. Sevilla, España: CD-ROM.2016.
- Royero Distribuidora. (2013). Obtenido de http://www.royerodistribuidora.com/nelsonroyero/images/nelsonroyero/lab_clinico/IMAGEN-PRUEBA-DE-ABUSO-DOA754.jpg
- Vargas, B. (2001). CÁTEDRA DE TOXICOLOGÍA CLÍNICA Y TOXICOLOGÍA II. Quito.

6. ANEXOS.

6.1. PREPARACIÓN DEL REACTIVO HIDÓXIDO DE SODIO 10 N.

Pesar 40 gramos de Hidróxido de sodio y diluir a 100 ml con agua destilada.

6.2. PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE ÁCIDO CLORHÍDRICO 2 N.

Medir 6.51 ml de ácido clorhídrico concentrado y diluir a 100 ml con agua destilada.



TRAZABILIDAD DEL DOCUMENTO, COPIAS Y COMPULSAS.

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