



Servicio Nacional
de Medicina Legal
y Ciencias Forenses

INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV- VIS.

Octubre, 2017



CONTROLES

ELABORACIÓN DEL INSTRUCTIVO.

Fase	Nombre / cargo	Firma	Fecha
Elaborado o Modificado por:	Bqc. Catalina Carrillo		27/03/2017
	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	 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 TÉCNICA

Nombre / Cargo	Firma	Fecha
Lcda. María Elisa Lara COORDINADORA DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES.		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 cuantitativa de Carboxihemoglobina por Espectrofotometría UV-VIS.	27/03/2017



ÍNDICE DE CONTENIDO

INFORMACIÓN BÁSICA.....	4
GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS.....	5
DESCRIPCIÓN DEL INSTRUCTIVO.....	6
NORMAS DE SEGURIDAD.....	8
BIBLIOGRAFÍA.....	9
ANEXOS.....	9

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1.....	8
--------------	---



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 CUANTITATIVA DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR ESPECTROMETRÍA UV-VIS.
Código del instructivo:	SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-02
Descripción:	<p>PROpósito: Estandarizar la determinación cuantitativa de carboxihemoglobina por espectrofotometría UV-VIS, tanto en muestras de pacientes vivos como en muestras post-mortem.</p> <p>ALCANCE: Este protocolo aplica en muestras de sangre, tanto en pacientes vivos como en muestras post-mortem.</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➤ 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.

Acápite: Manual de Química y Toxicología Forense.

Lineamientos:

- 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.

- **Carboxihemoglobina (COHB):** "compuesto formado cuando la hemoglobina entra en contacto con el monóxido de carbono, la afinidad de la hemoglobina por el monóxido de carbono es 218 veces mayor que su afinidad por el oxígeno, y no se modifica" (Miale, 1985).
- **Espectrofotometría:** análisis cuantitativo, que se basa en la capacidad de las sustancias de absorber la luz, a una longitud de onda (λ) determinada,



en proporción directa a la cantidad de materia presente. Mediante el espectrofotómetro se obtiene una medida del valor de la absorbancia de una muestra a determinada longitud de onda. (Quesada, 2007)

2.2. ABREVIATURAS.

- COHB: Carboxihemoglobina.
- N/A: No aplica.
- SNMLCF: Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.
- UV-VIS: Ultravioleta visible.

3. DESCRIPCIÓN DEL INSTRUCTIVO.

3.1. FUNDAMENTO TEÓRICO.

La carboxihemoglobina es una forma alterada de la hemoglobina, una proteína presente en los glóbulos rojos que transporta el oxígeno y el dióxido de carbono entre los pulmones y los tejidos corporales. La transformación de oxihemoglobina ($\text{Hb}.\text{Fe}.\text{O}_2$) en carboxihemoglobina ($\text{Hb}.\text{Fe}.\text{CO}$), son reacciones reversibles y dependen principalmente de la presión parcial de los gases y del pH sanguíneo. (Álvarez, S/F)

El monóxido de carbono se determina fácilmente en la sangre a partir de la carboxihemoglobina coloreada que se forma con la hemoglobina, usando espectrofotometría de absorción en disolución. El procedimiento consiste en la medición de las absorbancias a determinadas longitudes de onda de una muestra de sangre. Con los cálculos apropiados, puede obtenerse una conversión en porcentaje para la carboxihemoglobina. (Miale, 1985)

3.2. EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y CONDICIONES AMBIENTALES.

3.2.1. EQUIPOS:

- Balanza analítica;
- Pipetas automáticas y semiautomáticas de diferentes volúmenes; y,
- Espectrofotómetro UV-VIS.

3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO:

- Tubos de ensayo;
- Tubos con anticoagulante :Heparina de sodio o EDTA (personas vivas);
- Tubo sin preservante(post- mortem);
- Celdas para espectrofotometría;
- Vasos de precipitación;
- Balones aforados; y,
- Pipetas serológicas.



3.2.3. REACTIVOS Y ESTÁNDARES DE REFERENCIA:

- Ditionito de Sodio;
- Fosfato de Potasio Dibásico K_2HPO_4 ; y,
- Fosfato de Potasio Monobásico KH_2PO_4 .

3.2.4. MATERIALES VARIOS:

- Algodón;
- Guantes desechables;
- Papel absorbente; y,
- Gradilla.

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 estipulaciones:

- Medir 12ml de la solución hemolizante en un tubo de ensayo y agregar 100ul de la muestra de sangre, homogenizar.
- Dejar en reposo a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Medir 2.3ml de solución diluyente de COHB en un tubo de ensayo y adicionarle 100ul del hemolizado, mezclar.
- Dejar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Leer las absorbancias a 420 y 432nm, utilizar como blanco la solución diluyente de COHB.

Nota Técnica: la composición y preparación de las soluciones hemolizante y diluyente de COHB, se hallan en el acápite de Anexos, como Anexo N°6.1.



3.5. MÉTODO DE CÁLCULO:

Se deberá aplicar la siguiente ecuación para calcular la fracción de COHB:

$$\%COHB = \frac{1 - (A_R \times F_1)}{A_R(F_2 - F_1) - F_3 + 1} * 100$$

En donde:

A_R es el radio A_{420}/A_{432} del hemolizado en solución diluyente de COHB;

$F_1 = 1.3330$;

$F_2 = 0.4787$;

$F_3 = 1.939$; y,

Las constantes F_1, F_2, F_3 son calculadas de las absorbancias molares de la COHB a 420 y 432nm.

Nota Técnica: la matriz de cálculo automático de la fracción de COHB se halla en el acápite de Anexos como Anexo N°6.2, en modo hipervínculo para su visualización en medio digital.

3.6. RESULTADOS Y ANÁLISIS:

la determinación de resultados será estipulada en función de la siguiente tabla:

TABLA 1
VALORES REFERENCIALES DE COHB

VALOR COHB	INTERPRETACIÓN CLÍNICA
<2%	No fumadores, pobladores de áreas rurales
2-4%	Fumadores pasivos
5-10%	Fumadores
12-20%	Intoxicación leve a moderada, cefaleas, etc.
20-30%	Intoxicación aguda
50-70%	Coma
>70% y más	Muerte rápida

(Repetto, 2009)

4. NORMAS DE SEGURIDAD.

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



5. BIBLIOGRAFÍA.

- Álvarez, S. (S/F). Determinación de carboxihemoglobina en sangre. México: Universidad Autónoma de México.
- Miale, J. (1985). Hematología, Medicina de Laboratorio. España: Reverté S.A.
- Quesada, S. (2007). Manual de experimentos de laboratorio para bioquímica. Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia.
- Repetto, M. (2009). Toxicología Fundamental. España: Diaz de Santos.

6. ANEXOS.

6.1. Preparación de reactivos:

- Buffer: Preparar una solución 0.1mol/l K₂HPO₄ / KH₂PO₄ pH= 6.85; (pesando 5.40gr de K₂HPO₄ y 9.38gr de KH₂PO₄ en 1 litro de agua desionizada.).
- Solución hemolizante: Diluir el Buffer 1:10 con agua desionizada.
- Solución diluyente de COHB: Agregar 25 mg de Ditionito de Sodio en 20mL del Buffer justo antes de usar.

6.2. Tabla de cálculo para la concentración de Carboxihemoglobina. Visualización digital. Ver [Hipervínculo](#).



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