



Servicio Nacional
de Medicina Legal
y Ciencias Forenses

INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES O DROGAS ALCALINAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Octubre, 2017



CONTROLES

ELABORACIÓN DEL INSTRUCTIVO.

Fase	Nombre / cargo	Firma	Fecha
Elaborad o o Modificad o por:	Bqc. Catalina Carrillo		21/04/2017
	Mgs Luz Cadavid		
	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 COORDINADOR GENERAL DE PLANIFICACIÓN Y GESTIÓN ESTRATÉGICA		29/09/2017

APROBACIÓN DEL INSTRUCTIVO.

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 Alcaloides o Drogas Alcalinas en Muestras Biológicas.	21/04/2017



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 ALCALOIDEOS O DROGAS ALCALINAS EN MUESTRAS BIOLÓGICA.
Código del instructivo:	SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-05
Descripción:	<p>PROPÓSITO:</p> <p>Estandarizar la determinación de alcaloides o drogas alcalinas en muestras biológicas.</p> <p>ALCANCE:</p> <p>Se aplica en muestras biológicas (sangre, suero sanguíneo, orina contenido gástrico, vómito y vísceras) y sustancias sospechosas de causar intoxicación (medicamentos, bebidas, alimentos, 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➤ Art. 459. Actuaciones y Técnicas Especiales de Investigación. Numeral 1.



Lineamientos:

- **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.

- **Alcaloide:** "compuesto de origen vegetal, con uno o más átomos de nitrógeno que le confieren carácter de base orgánica." (Repetto M. , 2016)
- **Drogas:** "1. sustancia que cuando es absorbida por organismos puede modificarles una o más de sus funciones. " "2. Término usado para designar medicamentos (América) y sustancias de uso abusivo (drogas



de abuso)". (Repetto M. , 2016)

- **Drogas alcalinas:** "sustancias químicas en cuya estructura existe predominio de radicales o grupos alcalinos" (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.
- **Rf:** Factor de Retención
- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **SNMLCF:** Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.

3. DESCRIPCIÓN DEL INSTRUCTIVO.

3.1. FUNDAMENTO TEÓRICO.

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. (Vargas, 2001)

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, entre otros.

Estas drogas de origen natural o sintético, usadas por prescripción médica; como drogas de abuso; fines autolíticos o con fines delictivos, pueden llegar a causar la muerte de una persona pudiendo determinarse su presencia en muestras biológicas mediante métodos como screening de drogas, cromatografía de capa fina y otros.

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;
- Lámpara UV; y,
- Sistema de revelado: Nebulizador y bomba de vacío.

3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO:

- Embudos de separación;
- Erlenmeyer;
- Tubos de 15 ml;
- 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.

- Amoniaco;
- Cloroformo;
- Sulfato de sodio anhidro;
- Acetato de etilo;
- Metanol;
- Reactivo de Dragendorff ;
- Eluente de elección ; y,
- Acetato de etilo: 8.5 / Metanol: 1 / Amoniaco: 0.5
- Eluentes alternativos o de confirmación:
 - ✓ Tolueno: 45 / Acetona: 45 / Etanol: 1 / Amoniaco 3
 - ✓ Cloroformo: 8.5 / Metanol: 1 / Amoniaco 25%: 0.5

3.2.3.2. ESTÁNDARES/PATRÓN:

- Anfetaminas;
- Metanfetaminas;
- Benzodiazepinas;
- Antidepresivos tricíclicos;
- Cocaína;
- Derivados del Opio;
- Vegetales: Escopolamina, otros.; y,
- Medicamentos varios de estructura alcalina.



3.2.3.3. OTROS:

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

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 BENZODIACEPINAS positivo, se procederá a realizar hidrólisis y posteriormente una purificación en medio ácido de la muestra, como se describe a continuación:

➤ **Hidrólisis/purificación (para metabolitos de benzodiazepinas).**

- ✓ A 10 ml de orina, acidificar con 0.2 ml de HCl conc.
- ✓ Incubar a B.M. por 60 min.
- ✓ Extractar con 25 ml de cloroformo
- ✓ Separar y descartar la fase orgánica (cloroformo) que contiene impurezas solubles en medio ácido.

➤ **Extracción:** Este procedimiento se debe realizar para todas las drogas alcalinas positivas y las que previamente fueron hidrolizadas y purificadas (benzodiazepinas), descritas en el párrafo anterior.

- ✓ A la fase acuosa, alcalinizar con amoníaco hasta pH 8.5 – 9.0.
- ✓ Extractar en un erlenmeyer con 20 ml. de cloroformo, por agitación manual o mecánica.
- ✓ Separar la fase orgánica, si es necesario centrifugar.
- ✓ Secar mediante filtración en sulfato de sodio anhidro.

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 en 1 ml. de cloroformo para análisis en CCF

3.4.1.1.2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF).

- Con el extracto obtenido en los casos anteriores, 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 eluyente 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
- Revelar con reactivo de Dragendorff. (las manchas aparecen de color rojo ladrillo).
- Identificar por comparación con los RFs de los estándares.

3.5. MÉTODO DE CÁLCULO:

N/A

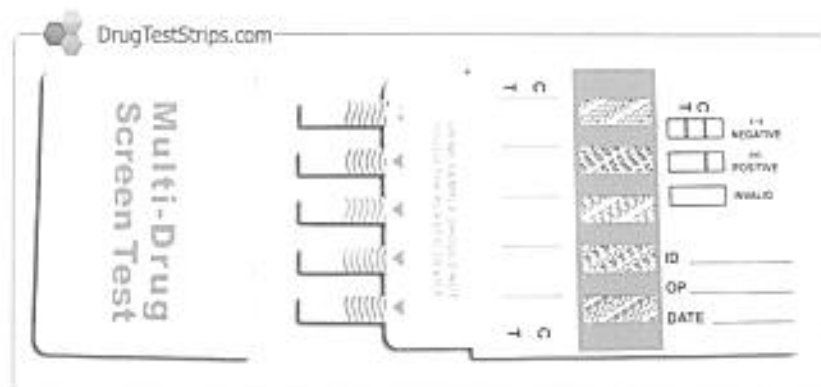
3.6. RESULTADOS Y ANÁLISIS:

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 con los Rf de los estándares con las muestras y a su vez, la coloración rojo – ladrillo observada después de su revelado.

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.

- Flanagan, R. y. (1995). Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos Para Laboratorios de Baja Complejidad. Gêneva, Argentina.
- 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 DRAGENDORFF.

Preparación de Solución A:

Mezclar conjuntamente 2 g. de Subnitrito de Bismuto, 25 ml de ácido acético y completar con agua destilada hasta 100 ml.

Preparación de Solución B:

Disolver 40 g. de Ioduro de Potasio en 100 ml de agua destilada.

Preparación del reactivo Dragendorff:

Mezclar 10 ml de Solución A+ 10 ml de Solución B+ 20 ml de ácido acético y completar hasta 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