

Capítulo 4

Tóxicos Volátiles y Gaseosos.

Autores:

Dra. Leda Giannuzzi.

Profesora Adjunta de la Cátedra de Toxicología y Química Legal de la UNLP.

Dra. Mabel Tomas.

Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Toxicología y Química Legal de la UNLP.

4. Introducción.

Se clasifican como tóxicos volátiles y gaseosos a todas las sustancias que independientemente de su estado físico, puedan separarse de la matriz que los contienen por destilación simple, destilación por arrastre con vapor, microdifusión y cromatografía gaseosa empleando head-space.

En forma general podríamos decir que las vías de entrada de estos tóxicos al organismo es la digestiva y la pulmonar, siendo también importante la vía cutánea para las sustancias más lipofílicas. Entre los tóxicos gaseosos más relevantes encontramos: monóxido de carbono, ácido cianhídrico, ácido sulfhídrico, arsina, estibidina, cloro, óxidos de nitrógeno, bromo, ozono, amoníaco, fosfina, entre otros.

Entre los tóxicos volátiles más importantes encontramos: ácido acético, cetonas, aldehídos, benceno, fenol, alcoholes primarios (etanol, metanol), glicoles, nitro y dinitrobenceno, éter, cloroformo, tetracloruro de carbono, fósforo, plaguicidas organoclorados, carbamatos, organofosforados, piridina, etc.

La mayoría de los compuestos provocan intoxicación aguda y muerte rápida, por ello, las investigaciones toxicológicas se realizan en sangre y en muestras obtenidas del tracto gastrointestinal o respiratorio donde se encuentran estos tóxicos en grandes cantidades. En el presente capítulo se presentan diversos protocolos de análisis de los tóxicos gaseosos y volátiles que con mayor frecuencia se presentan en un laboratorio de toxicología.

4.1 Tóxicos gaseosos.

Los tóxicos gaseosos son venenos presentes en el aire que generalmente se encuentran en estado gaseoso y alcanzan el cuerpo por inhalación. Un adulto inhala una masa de 15 kg de aire por día y simultáneamente expone una gran superficie de su cuerpo a xenobióticos. Los efectos tóxicos pueden desarrollarse muy rápidamente ya sea en forma sistémica (ácido clorhídrico, sulfuro de hidrógeno) o localmente en el tracto respiratorio (cloro o dióxido de azufre). Por otro lado, la exposición crónica a cloro, dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno y ozono en pequeños niveles encontrados en el aire ambiental puede afectar la función pulmonar.

Altas concentraciones de gases tóxicos como monóxido de carbono y cianhídrico se encuentran en situaciones de desastre químico debido a fuegos, explosiones pueden rápidamente causar la muerte a las personas que toman contacto con ellos.

La exposición a gases tóxicos ya sea en la industria o en aire urbano ha sido objeto de regulaciones. Así la American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH, 1996) regula la exposición en el ambiente de trabajo. Ha establecido el llamado TLV-TWA (Threshold Limit Values-Time Weighted Average) para cada tóxico siendo la concentración media de sustancia química en el aire ambiental tras una exposición repetida de, 8 horas al día, durante 5 días de la semana, durante toda una vida profesional y que no producen efectos nocivos en la mayoría de los trabajadores. También se encuentra el valor de STEL (Short Time Exposición Level) referido a la concentración máxima a la cual un individuo puede estar expuesto durante un período continuo y hasta 15 minutos, sin sufrir efectos adversos, siempre y cuando no reproduzcan mas de cuatro de estas situaciones por día y estando separadas como mínimo en 60 minutos.

Otros valores de exposición desarrollados y periódicamente revisados son el RELs (Recommended Exposure Limits) publicados por National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH, 1994). También el Occupational Safety and Health Administration (OSHA, 1993) recomienda niveles de exposición dados por (PELs Permissible Exposure Limits como valore límite de exposición permitido. Estos límites y los valores alemanes MAK (Maximun Concentration in the Workplace son comparables a los valores TLV-TWA. Estas concentraciones son dadas en ppm, (ml/m³) o (mg/m³) a 20°C y presión de 1013 hPa.

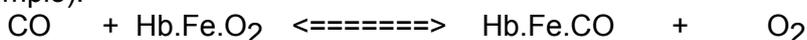
4.1.1 Investigación de monóxido de carbono en medios biológicos.

4.1.1.1 Características generales y mecanismo de acción.

El monóxido de carbono es un gas incoloro, inodoro, insípido y no irritante que se origina durante la combustión incompleta del carbón o derivados combustibles con carbono. Las fuentes productoras más frecuentes son braseros, estufas, calefones, hornos, incineradores, plásticos y automóviles en mal estado de funcionamiento.

La toxicidad del monóxido de carbono (CO) se debe a su combinación con la hemoglobina para formar carboxihemoglobina (COHb). En dicha forma la hemoglobina no libera oxígeno, dado que ambos gases (O₂ y CO) reaccionan con el grupo hemo en la molécula tetramérica de la hemoglobina. Sin embargo, la afinidad del monóxido de carbono por la hemoglobina es cerca de 240 veces mayor que por el oxígeno, de esta manera, la intoxicación puede ocurrir aún cuando pequeñas cantidades de CO se encuentren presentes en la atmósfera.

En el caso de personas intoxicadas, cuando el paciente es removido del ambiente contaminado, la carboxihemoglobina desaparece rápidamente, particularmente cuando se administrada oxígeno al 100 %. Sólo trazas pueden ser detectadas cuando el paciente alcanza el hospital y de esta manera la determinación de carboxihemoglobina es raramente justificada en la clínica toxicológica. Sin embargo, no deja de ser útil la investigación de la metahemoglobina sobre todo cuando se ha inhalado sustancias oxidantes (óxidos del nitrógeno, por ejemplo).



La formación de oxihemoglobina (Hb.Fe.O₂) como de carboxihemoglobina (Hb.Fe.CO) son reacciones reversibles y dependen principalmente de la presión parcial de los gases respirados y del pH sanguíneo aunque otros factores como la temperatura y la concentración iónica tienen también incidencia.

La toxicidad del CO se manifiesta no sólo en la interferencia en el aporte de oxígeno por la sangre sino también ejerce efecto directo al unirse a los citocromos celulares como los presentes en las enzimas respiratorias y la mioglobina.

4.1.1.2 Consideraciones generales en la analítica toxicológica.

En casos de sujetos muertos debido a intoxicación con CO, el aspecto del cadáver y el color carminado de las vísceras constituyen manifestaciones propias de la intoxicación aguda. Dicho color resulta visible en los órganos como el cerebro, corazón, pulmones y la musculatura voluntaria. En los casos en que el sujeto está vivo, la sangre deberá extraerse, a lo sumo hasta dos horas después de la exposición, puesto que gran parte del monóxido resulta eliminado por vía pulmonar. Para casos mortales, la muestra de sangre deberá extraerse lo más rápido posible antes que se inicien los procesos putrefactivos.

Se ha demostrado que el monóxido de carbono no se absorbe post-mortem constituyendo su determinación un índice del contenido en el momento de la muerte. La carboxihemoglobina es un derivado muy estable y su presencia en sangre puede demostrarse después de la descomposición cadavérica así como en cadáveres sometidos a altas temperaturas. El color carminado típico de la carboxihemoglobina se observa en muestras de sangre cuando el porcentaje de saturación es del 30% o superior, distinguiéndose fácilmente de la oxihemoglobina o de la hemoglobina misma.

4.1.1.3 Toma de muestra.

La recolección de la muestra de sangre debe ser obtenida por punción venosa con anticoagulante (heparina) evitando la formación de burbujas o la entrada de aire a la jeringa. Se recomienda obtener sangre del corazón o de las venas gruesas como la femoral. El recipiente a utilizar para la conservación de la muestra debe estar escrupulosamente limpio, seco y cerrado en forma hermética.

4.1.1.4 Determinación analítica de carboxihemoglobina.

La determinación cuantitativa de la carboxihemoglobina en sangre puede realizarse por métodos espectroscópicos que se basan en los diferentes espectros de absorción que presentan la carboxihemoglobina respecto de la hemoglobina. En todos ellos se realizan medidas de absorción a distintas longitudes de onda de diluciones adecuadas de la sangre en estudio. Estas longitudes de onda corresponden a los máximos, mínimos o puntos isobélicos de absorción de cada una de las especies de hemoglobina que coexisten en la muestra.

Otra propiedad que es utilizada por estos métodos es la gran estabilidad que presenta la carboxihemoglobina respecto de la oxihemoglobina frente a reactivos reductores o metahemoglobinizantes. A ojo desnudo, la sangre con alto contenido de carboxihemoglobina

presenta un marcado tono carmín, mientras que la sangre con alto contenido de metahemoglobina es chocolate.

Se describen a continuación ensayos de tipo cualitativos que presentan carácter práctico para su identificación.

a) Ensayo de dilución:

El ensayo de dilución consiste en preparar soluciones sanguíneas al 1% en agua destilada de muestra a analizar y de sangre normal. Se observa simultáneamente ambos tubos de ensayo con luz natural difusa. La sangre normal presenta color rojo amarillento, mientras la muestra, si contiene carboxihemoglobina, presenta color carminado neto. Este ensayo es seguro y práctico.

b) Ensayo alcalino:

Se basa en la mayor estabilidad de la carboxihemoglobina con respecto a la hemoglobina en similares condiciones alcalinas.

En un tubo de ensayo colocar 3 a 4 gotas de la sangre a analizar y en otro tubo similar colocar igual número de gotas de sangre normal, agregar 15 ml de agua destilada y mezclar bien. Agregar a cada tubo 5 gotas de solución de hidróxido de sodio al 10% y mezclar bien. La sangre normal adquiere color castaño a castaño verdoso (hematina alcalina), mientras que la sangre oxicarbonada permanece inalterada (color carminado durante cierto tiempo). El ensayo ofrece un neto contraste y resulta positivo cuando la concentración de carboxihemoglobina es superior al 10%.

La sangre fetal interfiere en este ensayo dado que última produce una transformación retardada frente al hidróxido de sodio. A continuación se describen diferentes métodos para la cuantificación de carboxihemoglobina en sangre: espectrofotométrico, químico e infra rojo.

4.1.1.5 Determinación cuantitativa de la carboxihemoglobina por el método espectrofotométrico.

Algunos métodos espectrofotométricos emplean el sistema oxihemoglobina-carboxihemoglobina. El siguiente método se basa en que la sangre normal contiene varias formas de hemoglobina (la forma reducida, la forma oxidada, y pequeñas cantidades de metahemoglobina), y si un agente reductor como el ditionito de sodio es agregado a la sangre, la forma oxigenada y la metahemoglobina son cuantitativamente convertidas a la forma reducida que presenta un espectro como se presenta en la Fig.4.1. Debe recordarse que en caso de que la persona haya estado expuesta a sustancias metahemoglobinizantes esta determinación es poco recomendada.

El monóxido de carbono presenta mayor afinidad por la hemoglobina que el oxígeno mientras que la carboxihemoglobina no es reducida por el ditionito de sodio.

Así, la carboxihemoglobina permanece sin modificarse como se muestra en la curva A del espectro en la Fig.4.1 aún cuando se ha realizado un tratamiento con ditionito de sodio.

En la Fig. 4.1 se observa que la máxima diferencia de absorbancia para los espectros de carboxihemoglobina (A) y hemoglobina reducida (B) se presenta a 540 nm, mientras que a 579 nm presenta la misma absorbancia (punto isobéptico). El porcentaje de saturación de monóxido de

carbono en una muestra de sangre puede calcularse de la medida de la absorbancia a esa longitud de onda de la muestra saturada con monóxido de carbono (A), la muestra libre de monóxido de carbono (B) y la muestra sin tratar (C) luego de la reducción con ditionito de sodio.

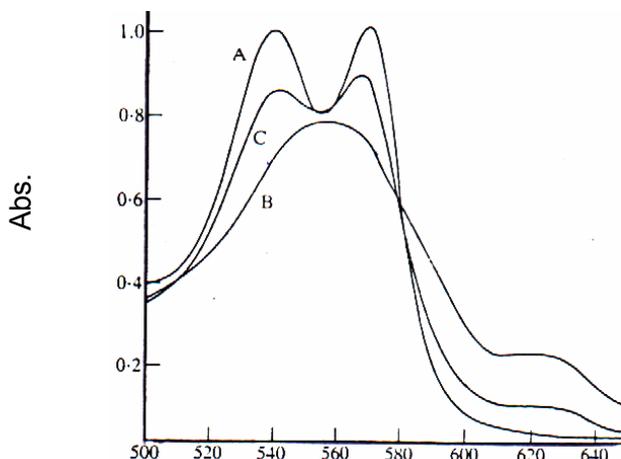


Fig. 4.1: Espectros de absorción de (A) carboxihemoglobina, (B) hemoglobina reducida y (C) muestra de sangre de paciente intoxicado con monóxido de carbono.

Reactivos.

Solución 0,1% de hidróxido de amonio.

Equipo

Espectrofotómetro UV visible

Procedimiento.

Diluir 0,2 ml de la muestra de sangre homogenizada con 25 ml de solución 0,1% de hidróxido de amonio y dividir la solución resultante en tres partes iguales A, B, y C. Saturar la solución A con monóxido de carbono mediante el burbujeo de gas a una velocidad que minimice la formación de espuma. Unos pocos minutos de burbujeo resultan suficientes. Por otra parte, la solución B se trata con oxígeno puro durante 10 minutos a los efectos de desplazar completamente el monóxido de carbono unido a la muestra.

Agregar una pequeña cantidad de ditionito a cada una de las soluciones A, B y C y también a 10 ml de la solución de amonio 0,1% y mezclar bien. Medir la absorbancia de cada solución a 540 y a 579 nm para cada solución A, B, y C. Se calcula la de relación de absorbancias a 540 a 579 para cada solución.

El porcentaje de saturación de carboxihemoglobina se calcula por la siguiente fórmula

$$\% \text{saturación} = \frac{(A_{540}/A_{579})_C - (A_{540}/A_{579})_B}{(A_{540}/A_{579})_A - (A_{540}/A_{579})_B} \cdot 100$$

Los valores normales aproximados para la relación de absorbancia son: carboxihemoglobina saturada 1,5 y hemoglobina reducida 1,1%. Considerando que el contenido de hemoglobina en sangre puede variar, el volumen de diluyente también debe ser modificado. La dilución que arroje un valor máximo de absorbancia cercano a 1 es la ideal.

4.1.1.6 Determinación cuantitativa de carboxihemoglobina mediante separación física de la carboxihemoglobina de otras hemoglobinas.

El método se basa en la alta resistencia relativa de HbCO al calor mientras que las otras formas de hemoglobina sufren coagulación. Esta técnica es simple de realizar y permite ser aplicada con resultados reproducibles si se mantienen estrictamente las condiciones indicadas: calentamiento a $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 5 minutos y pH $5,05 \pm 0,05$.

Reactivos.

1. Buffer acetato. Mezclar 1 volumen de solución 1 (300 ml de ácido acético glacial en 1 litro de agua destilada) mas 3 volúmenes de solución 2 (408 gr de acetato de sodio trihidratado disuelto en 1 litro de agua). El pH no debe variar de $5,05 \pm 0,05$.
2. Antiespumante. Mezclar el antiespumante con agua al 1% y se agita vigorosamente con algunas perlas de vidrio.

Equipos.

Baño termostático de agua a $55 \pm 0,05^\circ\text{C}$
Centrífuga a 5000 rpm. Capacidad 4 o más tubos de 10-15 ml. Espectrofotómetro UV- visible.

Procedimiento.

- 1) 5 ml de sangre a analizar previamente homogenizada se mezclan con 15 ml de agua destilada y 1 ml de antiespumante por inversión. La mitad de esta solución es separada en un tubo, rotulada y guardada en oscuridad. La otra mitad es saturada con CO durante 30 minutos asegurándose que el volumen de la solución sanguínea no cambie.
- 2) De las soluciones, aquella sin tratar y la tratada con CO se toma dos alícuotas de 1,0 ml son ubicadas en 4 tubos de centrífuga conteniendo 4,0 ml de buffer acetato.
- 3) Después de mezclar por inmersión dos veces cada tubo, los tubos se ubican en un baño termostático de agua a $55,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ exactamente por 5 minutos.
- 4) Luego los tubos se enfrían en agua fría durante otros 5 minutos y centrifugados a 5000 rpm durante 5 minutos.
- 5) 2,0 ml de cada uno de los cuatro sobrenadantes se diluyen con 10,0 ml de agua destilada y se mezclan 2 o 3 veces por inmersión en el tubo.
- 6) Para la lectura se requieren tres cubetas: la cubeta 1 (blanco) emplea agua destilada, la cubeta 2 es llenada con la solución de sangre sin tratar y la cubeta 3 con solución de sangre saturada con CO. La absorbancia de las dos soluciones se leen contra agua a 570 nm y 630 nm. Luego de la lectura, la cubeta 2 es vaciada y llenada con el duplicado de la solución de sangre sin tratar. La cubeta 3 también luego de la lectura es vaciada y llenada con el duplicado de la solución de sangre saturada con CO. Se repite la lectura a 570 y 630 nm. Los cálculos se realizan mediante la siguiente relación

$$\% \text{COHb} = \frac{(A_{570} / A_{630})_{\text{solucion sin tratar}}}{(A_{570} / A_{630})_{\text{solucion con CO}}} \cdot 100$$

7) Los valores duplicados no deben variar más de 2 a 3 % de saturación de COHb. Con valores de saturación de COHb menores a 20% dos tipos de dificultades pueden presentarse: primero, la lectura en el espectrofotómetro de muestra sin tratar es baja e incierta. Segundo, la coprecipitación de COHb con el precipitado de los derivados de hemoglobina puede ser un factor importante que tiende a disminuir la cantidad residual de COHb en el sobrenadante. El método arroja resultados reproducibles cuando la saturación de COHb es superior al 20%. Asimismo, el método es moderadamente sensible a los cambios que ocurren en la sangre luego del proceso postmortem.

4.1.1.7 Determinación cuantitativa de carboxihemoglobina por el método de Cromatografía gaseosa (CG).

La cromatografía gaseosa (CG) se considera una metodología universal para la determinación de compuestos con una presión de vapor lo suficientemente alta, por lo que en general se considera adecuada para tóxicos volátiles y gaseosos. Sin embargo, la determinación de monóxido de carbono por CG presenta diversos inconvenientes que es necesario tomar en cuenta en el momento de optar o no por la utilización de esta metodología.

Por un lado la elevada presión de vapor del monóxido de carbono requiere de columnas y/o de programas que sean capaces de separar al analito de los gases utilizados como carrier, generalmente helio o nitrógeno, de otros gases que pudiesen coexistir con el monóxido de carbono como el dióxido de carbono. Este inconveniente se subsana utilizando columnas capilares y programas de corrida cromatográfica que trabajan comenzando a temperaturas subambiente, típicamente a -20°C . Los equipos requeridos para estas condiciones cromatográficas son muy poco frecuentes en laboratorios de toxicología.

Por otro lado, la detección de la señal del monóxido de carbono a la salida de la columna CG se realiza mediante dos metodologías posibles. Una forma es la utilización de una post columna con un catalizador y condiciones de hidrogenación adecuadas para transformar al monóxido de carbono cuantitativamente en metano, luego de lo cual se mide con un detector común iónico de llama (FID). La otra forma es la utilización de un detector de conductividad térmica. Ni el detector de conductividad térmica, ni el catalizador post columna son elementos comunes en un laboratorio dedicado a la toxicología.

Finalmente, se ha informado que la cromatografía gaseosa de monóxido de carbono tiene una adecuada respuesta señal vs concentración sólo para niveles de monóxido por encima del 20% en sangre, de manera que no es adecuado para medidas en individuos con intoxicaciones subclínicas o para comparar individuos con niveles normales de CO en sangre.

4.1.1.8 Determinación cuantitativa de carboxihemoglobina por el método de Espectrofotometría Infrarroja.

En la determinación de monóxido de carbono en sangre y aire espirado, la espectrofotometría infrarroja confiere adecuada especificidad, condición que no presentan otros recursos analíticos depurados tales como cromatografía gaseosa. El procedimiento comienza con una extracción de los gases totales físicamente disueltos o combinados con la hemoglobina. El monóxido de carbono presenta al infrarrojo dos picos de absorción a 2120 y 2170 cm^{-1} ($4,6-4,7\text{ m}$) y no presenta otra absorción en el rango comprendido entre $700-4000\text{ cm}^{-1}$.

Los gases que absorben en esta región del espectro y que por lo tanto interfieren, son el diazometano, cloruro de nitrosilo y propano que muy difícilmente pueden hallarse en muestras de sangre. El dióxido de carbono puede mostrar interferencias cuantitativas por su elevada concentración relativa aún si su absorción máxima difiere de la del monóxido de carbono. Estas interferencias quedan excluidas con la adopción de sistemas de compensación o filtros adecuados.

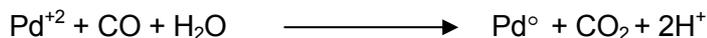
Los equipos permiten determinar monóxido de carbono en un rango de 0 a 1000 ppm. En el análisis de sangre, la espectrofotometría infrarroja utiliza un volumen total de 1 a 5 ml. El mismo se trata con ferricianuro ácido y los gases liberados se analizan en el espectrofotómetro infrarrojo.

Para establecer el porcentaje de saturación o el coeficiente de intoxicación debe saturarse otra fracción de la muestra con monóxido de carbono y analizarse en la misma forma, efectuando la pertinente corrección por el monóxido de carbono físicamente disuelto. Con adecuadas modificaciones, la espectrofotometría infrarroja posibilita el registro continuo de monóxido de carbono en aire (detectores o registradores continuos).

Por otra parte, los ensayos en aire espirado permitieron revelar su presencia en forma inmediata así como después de 30 minutos de haber fumado un cigarrillo.

4.1.1.9 Determinación de monóxido de carbono en sangre por métodos químicos.

Los métodos químicos emplean la propiedad del monóxido de carbono de reducir diversas sales metálicas. Uno de los elementos metálicos de mayor aceptación es el paladio (II). La capacidad reductora del monóxido de carbono se observa en la siguiente ecuación:



Este principio se emplea de diversas formas, una de ellas es el método de Gettler y Freimuth y mediante la microdifusión en cámaras de Conway.

4.1.1.9.1 Método de Gettler y Freimuth.

El monóxido de carbono liberado de la carboxihemoglobina por el ferrocianuro de potasio es arrastrado por aireación y pasado a través de un disco de papel embebido con Cl_2Pd . El CO produce una mancha oscura sobre el papel de filtro debido a la reacción del paladio que se reduce a Pd° . Por comparación de la intensidad de la mancha con muestras patrones, se puede obtener una concentración aproximada a la cantidad de CO presente en la muestra.

Técnica.

a) Reactivos.

- Solución de cloruro de paladio (0,5 g de cloruro de paladio, 0,5 ml de ácido clorhídrico concentrado que se llevan a 50 ml con agua destilada).
- Solución de ferricianuro de potasio-saponina: ferricianuro de potasio 32 g, saponina 0,8 g , agua bidestilada c.s.p 100 ml.
- Solución de ácido láctico (D:1,20) y llevar a 100 ml.
- Solución de acetato de plomo al 10%.
- Alcohol caprílico.
- Solución de cloruro cuproso amoniacal.

b) Procedimiento.

El dispositivo se presenta en la Figura 4.2. El tubo A contiene 5 ml de solución de cloruro cuproso amoniacal para retener el monóxido de carbono del aire e interferencias del medio del laboratorio. El tubo B contiene 2,0 ml de sangre, se añaden 4 ml de ferricianuro-saponina y 2 ml de solución de ácido láctico junto con 2 gotas de alcohol caprílico. El tubo C contiene perlas de vidrio en cantidad que alcancen 4 cm de altura y 5 ml de acetato de plomo. Entre los discos del flange se coloca un disco de papel de filtro Whatman N°3 cortado en forma circular humectado con la solución de cloruro de paladio y sujetado en forma segura mediante un pinza metálica para lograr el cierre hermético.

Se hace burbujear aire a través del dispositivo A aflojando la llave del frasco de Mariotte. La velocidad de flujo del aire debe ser de 26 ml/minuto. Después de 15 minutos, se detiene el burbujeo y se retira el papel reactivo, se lava con agua destilada para eliminar el exceso de solución de cloruro de paladio y la mancha obtenida. Finalmente se compara con la escala obteniéndose el grado de saturación de la sangre con respecto al monóxido de carbono.

La preparación de la escala se realiza saturando 10 ml de sangre oxalatada con un contenido de carboxihemoglobina de 80%-90% con monóxido de carbono puro, el cual se obtiene por descomposición del ácido fórmico por acción del ácido sulfúrico concentrado. Se hace burbujear el gas en la muestra de sangre durante 15 minutos.

Mezclando volúmenes iguales de la muestra saturada con sangre normal, se obtiene un grado de saturación equivalente al 50%, el cual se utiliza para la preparación de la escala mezclando diferentes volúmenes de sangre normal y sangre saturada con monóxido de carbono (Tabla 4.1). Cada muestra diluida en la forma expresada se somete al procedimiento señalado a fin de obtener las manchas testigo. La preparación de manchas para grados de saturación mayores al 50% no es necesaria en la práctica debido a que nunca se alcanzan valores superiores al 50% de saturación.

Dado que la capacidad de saturación de la sangre para el monóxido de carbono reside en el contenido de hemoglobina debe aplicarse el factor de corrección correspondiente para cada caso, debiendo valorarse el contenido de hemoglobina total del mismo.

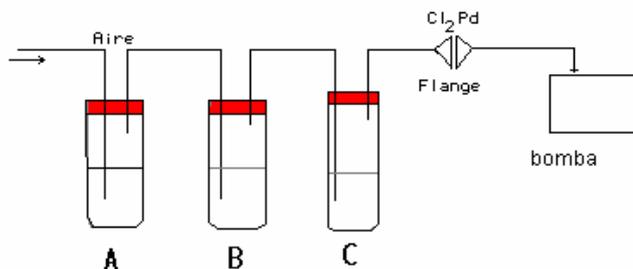


Fig. 4.2: Dispositivo empleado en la determinación de monóxido de carbono en sangre
Tres tubos de vidrio grueso con borde de 13 a 15 cm de largo y 2 cm diámetro.
Flange (dos discos de vidrio enfrentados para retención de papel de filtro)
Trampa de vacío, o bomba de extracción de ¼ HP.
Pinzas de Hoffman.
Perlas de vidrio.

Tabla 4.1: Preparación de la escala de saturación de monóxido de carbono

Volumen de sangre con 50% saturación CO (ml)	Volumen de sangre (ml)	de normal	Porcentaje de saturación obtenido
4	1		40%
3	2		30%
2	3		20%
1	4		10%
1	5		5%

4.1.1.9.2 Método de Microdifusión.

Se basa en el poder reductor del monóxido de carbono que al actuar sobre una solución de Cl_2Pd lo transforma en Pd° . La reacción se realiza en cámaras de Conway que poseen en el compartimiento externo la muestra de sangre y el agente liberador (ácido sulfúrico) y en el interno el agente atrapante (Cl_2Pd). En este caso se produce la captación y la oxidación del monóxido de carbono forzándose la remoción completa del mismo al cabo de un tiempo y temperatura determinado. El exceso de Cl_2Pd se valora espectrofotométricamente con IK en presencia de goma arábica.

Reactivos:

- Solución de cloruro de paladio: disolver 0,222 g de cloruro de paladio en 25 ml. de ácido clorhídrico 0,01N y completar a 250 ml con ácido clorhídrico. Se prepara en el momento.
- Acido sulfúrico 10% (p/v)
- Goma arábica al 0,1%
- Solución de yoduro de potasio al 15% (p/v)

Equipos:

Centrífuga a 5000 rpm.
Espectrofotómetro UV visible

Procedimiento:

En el centro de la cámara de Conway colocar 0,5 ml de Cl_2Pd (0,01N), en la periferia y separados se colocan 0,25 ml de H_2SO_4 y 0,25 ml de la muestra (sangre entera). Cubrir con la tapa sellando con grasa siliconada para evitar posibles pérdidas.

Mezclar la sangre con el ácido sulfúrico mediante un suave movimiento de balanceo. Dejar difundir 1 hora a temperatura ambiente. La existencia de monóxido de carbono se evidencia en forma indirecta a través de la aparición de una pátina platina de paladio metálico en el compartimiento interno. Con una pipeta capilar se extrae la totalidad de la solución del compartimiento interno (Pd° y exceso de cloruro de paladio).

Luego se centrifuga con el objeto de separar el precipitado de Pd y se transfiere 0,1 ml del sobrenadante a un matraz de 10ml. En otro matraz de 10 ml, se coloca 0,1 ml de solución de Pd (blanco). A cada matraz se agrega 1,0 ml de solución de goma arábica al 0,1% y 1,0 ml de IK al 15 %, se mezcla bien y se lleva a volumen. Se realiza la determinación de la densidad óptica a 500 nm llevando a cero con agua destilada. El exceso de sal de Pd origina con el ion yoduro el complejo

I_4Pd^2 . En forma paralela se trabaja con una solución de Cl_2Pd no difundida de manera de tener un punto de referencia de absorbancia. Luego se lee la absorbancia a 500 nm.

Expresión de resultados:

Con el punto de referencia se calcula la concentración de CO en la muestra inicial.

$$mgCO\% = \frac{DO_t - DO_D}{DO_t} 0,05335 * 520$$

Donde DO_t y DO_D representan la densidad óptica del testigo y la muestra desconocida, respectivamente. El valor 0,053 corresponde a 0,1 ml de la solución de paladio 0,01N con peso equivalente de $106,7/2 = 53,35$. El factor 520 corresponde al factor de conversión (CO/Pd) provenientes de 0,1 ml solución expresados en los 2,0 ml de muestra de sangre analizada y multiplicada por 100 para expresar el resultado en porcentaje mgCO% ($(28/106,7) \cdot (2/0,1) \cdot 100 = 520$).

El resultado puede expresarse en ml % aplicando el factor 0,8. Para expresar el resultado en porcentaje (saturación de la hemoglobina), es necesario conocer la concentración de la misma y teniendo en cuenta que 1g de hemoglobina fija 1,34 ml de CO, se puede calcular el valor correspondiente de saturación.

4.1.2 Interpretación de Resultados.

El monóxido de carbono es el producto endógeno del catabolismo del hemo con un valor de saturación de carboxihemoglobina entre 0,4-0,7%. El valor promedio de carboxihemoglobina encontrada en sangre de individuos no fumadores que habitan zonas urbanas es del 1-2%. Dicho valor llega a 5-6% en individuos fumadores.

El valor TWA es de 25 y 30 ppm dado por American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH) y Maximun Concentration in the Workplace (DFG, 1996) (MAK) con un valor máximo de 6% de HbCO para una persona que trabaja 8 hs. en condiciones de actividad física normal. El Occupational Safety and Health Administration (OSHA) recomienda un valor de 50 ppm y National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) de 35 ppm con un valor de (Short exposición) referido a 15 minutos de exposición (STEL) de 200 ppm. Estos valores deben ser menores para personas de mayor riesgo como son mujeres embarazadas cuyo valor de HbCO no debe exceder 2,7%.

Los valores encontrados en los casos de envenenamiento fatales registrados representan valores superiores a 50% de saturación. En víctimas de incendios se han registrado niveles de carboxihemoglobina entre 25-55% con un valor medio de 40%. Sin embargo, también se ha informado que la carboxihemoglobina en víctimas de incendio puede no ser significativamente alta, en especial si el cuerpo está parcialmente carbonizado y la hemoglobina total es baja.

4.1.3 Identificación y dosaje de ácido cianhídrico en medios biológicos.

El ácido cianhídrico (HCN) es un líquido volátil, incoloro de olor característico a almendras amargas que presenta gran difusibilidad debido su elevada presión de vapor. Las sales de cianuro (sodio o potasio) son de interés toxicológico. El cianuro de sodio es más tóxico que el de potasio porque desprende mas HCN por gramo de compuesto.

El mecanismo de acción tóxica lo ejerce inhibiendo la citocromo c oxidasa bloqueando de este modo la respiración celular generando hipoxia o anoxia citotóxica. También se combina con proteínas que posean hierro en su máximo estado de oxidación (III) como la metahemoglobina. Existe una enzima cuyo funcionamiento depende de la provisión de aminoácidos azufrados, la cianuro azufre transferasa, que degrada el cianuro a tiocianato.

La exposición de grandes cantidades de cianuro puede ser mortal. La severidad de los efectos depende en parte de la forma química del cianuro, la cual puede ser cianuro de hidrógeno gaseoso o sus sales. La exposición a elevados niveles de cianuro durante corto tiempo daña el cerebro y el corazón, y puede causar coma y muerte.

Personas que han respirado cianuro de hidrógeno en concentraciones de 546 ppm han muerto después de 10 minutos de exposición, mientras que 110 ppm fueron un riesgo cierto de muerte después de una hora de exposición.

Estos síntomas se desarrollan rápidamente, dependiendo de la cantidad ingerida. Los efectos son similares si grandes cantidades de cianuro son ingeridos, bebidos, respirados o tocados. El contacto de la piel con sales de cianuro produce irritación. La exposición crónica a cianuro produce daños en la glándula tiroidea.

La sintomatología puede ser de tipo superaguda con pérdida inmediata del conocimiento, convulsiones, rigidez muscular y la muerte ocurre en pocos minutos (alrededor de 10). La intoxicación aguda presenta tres períodos. En el primero se presenta ardor y anestesia en la boca estómago, luego vértigos y zumbidos. En el segundo período se manifiesta pérdida del conocimiento con convulsiones, contractura espasmódica de maxilares, pulso irregular, cianosis. En el tercer período se presenta relajación muscular y muerte por parálisis del centro respiratorio bulbar y paro cardíaco.

La etiología de la intoxicación con ácido cianhídrico (HCN) descrita es muy variada. Las principales fuentes de compuestos cianurados son ciertas industrias en las cuales el HCN presenta aplicaciones comerciales como son la galvanoplastia, extracción de metales preciosos (oro y plata), producción de gomas sintéticas como resinas acrílicas, poliuretano, manufactura de plásticos, así como el empleo de HCN para desinfección como insecticida y raticida.

Otra fuente de compuestos cianurados son los alimentos, como algunos productos vegetales que contienen glucósidos cianogenéticos que por hidrólisis (ácida, alcalina o enzimática) dan origen al HCN. Entre estos se encuentran especies de porotos, semillas de lino, sorgo, almendras amargas, mandioca, habas, así como en semillas de manzanas y peras y en bebidas fermentadas como el "Kirsh", el aguardiente de cerezas.

El uso de raíces de cassava como fuente primaria de alimento en países tropicales produce niveles elevados de cianuro en sangre. Se ha observado daños al sistema nervioso central, debilidad en las extremidades, caminar dificultoso y sordera. La exposición crónica a las raíces de cassava también se ha vinculado a función tiroidea disminuída.

Debe recordarse que la combustión de plásticos conteniendo nitrógeno (uretanos) es una fuente de cianhídrico gaseoso en incendios. La presencia de plásticos en los ambientes modernos obliga, en casos de muertes por incendio, a determinar no sólo el monóxido de carbono sino el cianuro, debido a que por su elevada toxicidad suele ser el responsable real de la muerte.

También se ha descrito otra fuente de compuestos cianurados en el uso farmacológico como en antiguos antitusígenos como agua de laurel cerezo. Se lo ha empleado en ejecuciones

en la llamada cámara de gas y se han registrado muchos casos de intoxicaciones voluntarias y homicidas.

Todos los análisis de cualquier material sospechoso de contener cianuro deben realizarse bajo campana de extracción. Resulta útil tener a mano hipoclorito de sodio para fijar y destruir el cianuro en casos de derrames.

4.1.3.1 Consideraciones generales de la analítica toxicológica.

La investigación de ácido cianhídrico puede realizarse con diferentes tipos de muestra: vísceras (que necesitarán de una previa homogenización), líquidos biológicos, sangre u orina, alimentos (productos vegetales o animales) y medicamentos.

La sangre venosa presenta un color rojo vivo característico. En cadáveres frescos se observa color rojo cereza así como manchas de color rojo más o menos intenso. Junto al olor típico de almendras amargas que desprenden los órganos se observan numerosas hemorragias pequeñas en las serosas.

Se debe prestar especial cuidado en casos de suicidio con cianuro al realizar la autopsia, en especial al retirar o manipular el contenido gástrico, dado que por su pH puede liberar cantidades peligrosas de cianhídrico. Cualquier envase obtenido del lugar del hecho debe ser analizado bajo campana de extracción de gases.

El recipiente que contiene la muestra debe estar escrupulosamente limpio, seco y cerrado herméticamente para evitar pérdidas. Si el material son vísceras, no deben conservarse en formol porque este reacciona con el ácido cianhídrico formando cianhidrinas de las que no se puede liberar HCN. Las muestras deben conservarse en frío para evitar la acción enzimática y bacteriana sin agregado de conservantes.

Existen tres tipos de determinaciones del ácido cianhídrico: los ensayos inmediatos o preliminares, los ensayos mediatos y los ensayos cuantitativos.

4.1.3.2 Ensayos cualitativos o inmediatos.

La identificación directa del HCN en el recipiente que contiene el material es posible gracias a su elevada presión de vapor a temperatura ambiente y procesos hidrolíticos que ocurren con cierta rapidez por las condiciones del medio, pH, temperatura, etc.

En la atmósfera del recipiente se libera CNH que puede deberse a dos tipos de procesos: hidrolíticos y putrefactivos

Hidrolíticos



El equilibrio se desplaza hacia la derecha. En vísceras en estado putrefactivo se libera CNH de acuerdo con



Los ensayos inmediatos son técnicas que se realizan en la atmósfera del recipiente que contiene la muestra mediante el empleo de los llamados papeles sensibles. Se utilizan papeles impregnados en diferentes reactivos:

4.1.3.2.1 Utilización de papel de guayaco.

El ensayo se fundamenta en el aumento del potencial de oxidación de las sales cúpricas al pasar a sales cuprosas insolubles o poco disociadas. El sistema Cu(II)-cianuro se acopla a un compuesto reductor (resina de guayaco) que por oxidación origina un derivado coloreado (de color castaño vira al azul).

Reactivos:

- Solución acuosa de sulfato de cobre al 0,2%
- Solución alcohólica de resina de guayaco al 10% recién preparada.

Procedimiento.

En el momento de su uso, se embebe una franja de papel de filtro en una solución de SO_4Cu al 0,2 % dejando escurrir el exceso. Luego se embebe en una solución alcohólica de resina de guayaco al 10% de reciente preparación. El reactivo del papel de guayaco colocado en la boca del recipiente que contiene el material a analizar y el O_2 producido en la reacción forman un compuesto de color azul en forma inmediata.



Un ensayo negativo permite descartar la presencia de HCN dada su sensibilidad. Un ensayo positivo no entrega mayores datos y requiere confirmación con ensayos específicos. El ensayo presenta interferencias de tipo oxidantes directos de la resina de guayaco y reductores que actúan de la misma forma que el cianuro sobre las sales de cobre.

Es un ensayo clásico, sensible pero inespecífico, pudiendo detectarse hasta 0,25 μg de ácido cianhídrico.

4.1.3.2.2 Ensayo con o-tolidina.

Presenta igual fundamento que la reacción anterior pero la visualización se realiza con o-tolidina. También se puede usar bencidina, fenoftaleína o cualquier sustancia que al oxidarse forme un complejo coloreado. Esta reacción es altamente sensible pero inespecífica.

Reactivos.

- Solución acuosa de sulfato de cobre al 0,2%
- Solución alcohólica de o-tolidina al 1%.

Procedimiento

El ensayo es similar al anterior. En presencia de ácido cianhídrico se observa en forma inmediata color azul verdoso que rápidamente vira al azul neto. Presenta mayor sensibilidad que el ensayo guayaco-cúprico.

4.1.3.2.3 Ensayo de Grignard.

El ensayo se fundamenta en que el ácido pícrico en presencia del HCN, liberado de la muestra ácida, forma isopurpurato alcalino, de color rojo al rojo naranja en el transcurso de cinco minutos.

Reactivos

- Solución acuosa de ácido pícrico 1% caliente que antes del enfriamiento se agregan 10 gr de CO_3Na_2 .

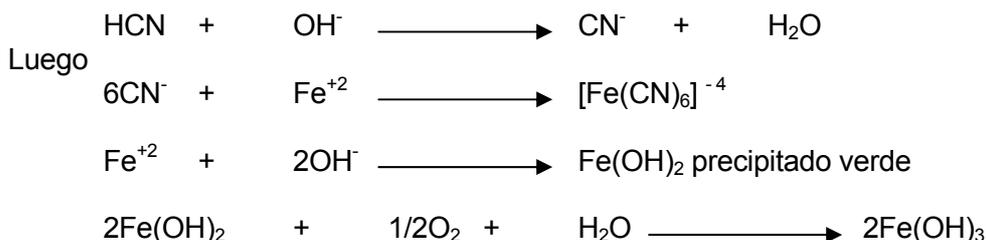
Procedimiento.

Embeber tiras de papel filtro con solución acuosa de ácido pícrico y escurrir el exceso. Si el papel se prepara en el momento, el ensayo presenta su máxima sensibilidad. El reactivo dura indefinidamente. El papel es puesto en la boca del recipiente que contiene la muestra a analizar.

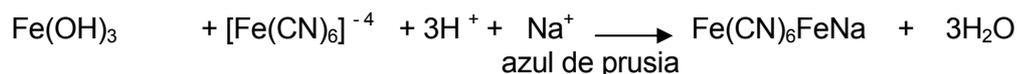
Un color rojo naranja indica resultado positivo.

4.1.3.2.4 Ensayo de Magnin.

Se basa en la formación de azul de Prusia.



en medio HCl



Reactivos

- Solución acuosa de hidróxido de sodio al 2%
- Solución acuosa de sulfato ferroso al 2% recientemente preparada.

Procedimiento.

Se impregna una tira de papel con hidróxido de sodio al 2% y se expone en el interior del recipiente unos minutos. Se retira y se extiende sobre una cápsula de porcelana. Se distribuyen sobre la superficie expuesta 4 gotas de solución de sulfato ferroso 2%. Se observa un precipitado verdoso que luego pasa a castaño (hidróxido férrico). Finalmente por agregado de unas gotas de ácido clorhídrico concentrado se observa color azul por formación azul de Prusia. Es una reacción poco sensible pero muy específica

Siempre se efectúan por lo menos dos reacciones: una muy sensible y otra muy específica. Si las dos reacciones arrojan resultados positivos se realiza el aislamiento.

4.1.4 Ensayos mediatos.

4.1.4.1 Aislamiento e identificación del ácido cianhídrico de cianuros alcalinos.

Aislamiento.

Cuando se sospecha la presencia de ácido cianhídrico mediante los ensayos antes especificados, se procede al aislamiento y posterior identificación. Para la realización de los ensayos mediatos, se requiere de una separación previa del HCN de la muestra. Son adecuadas una destilación simple o una microdifusión.

En la destilación simple se agrega al material ácido tartárico. El destilado se recoge en hidróxido de sodio para evitar pérdidas del ácido cianhídrico liberado. En el caso de muestras en estado de putrefacción se debe agregar al material a destilar acetato básico de plomo para retener el ácido sulfhídrico.

Reactivos:

- Acido tartárico al 10%.
- Hidróxido de sodio al 10%.

Equipos

Aparato de destilación simple.

Procedimiento

Colocar 10 gr del material biológico en un matraz de destilación y cubrir con agua (aproximadamente 60 ml). Agregar 10 ml de ácido tartárico al 10% y destilar recogiendo sobre 5 ml de NaOH 10%. Se calienta al principio suavemente para evitar la formación de espuma y una vez alcanzado el punto de ebullición se eleva lentamente la temperatura. Es importante que la extremidad del tubo de desprendimiento conectado al extremo del refrigerante tome contacto con la solución alcalina. Suspender la destilación cuando hayan pasado alrededor de 1/3 del volumen inicial. Medir el volumen destilado para realizar posteriormente determinaciones cuantitativas.

4.1.4.2 Técnica del Azul de Prusia modificada o técnica de Chellen-Klassen.

El ensayo se fundamenta en la formación de un precipitado azul por formación de azul de prusia (ferricianuro férrico) a partir del destilado, afectuando un ajuste previo del pH a un valor de 8 para favorecer la precipitación.

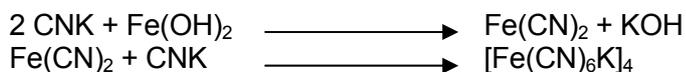
Reactivos

- Solución alcohólica de fenoftaleína al 1%.
- Acido sulfúrico 0,1N.
- Solución acuosa de carbonato de sodio al 10%.
- Solución de sulfato ferroso al 1% recientemente preparada.
- Acido clorhídrico concentrado.
- Solución acuosa de hidróxido de bario al 10%.

Procedimiento.

A 1ml de destilado se le agrega 2 gotas de solución de fenolftaleína (medio básico rosada), y luego lentamente solución diluida de ácido sulfúrico hasta vivir el indicador a incolora. Luego se lleva a pH alcalino con solución de carbonato de sodio al 20% gota a gota hasta viraje al rojo. Agregar 3 gotas de solución de sulfato ferroso al 2% y dejar reposar 3 minutos. Acidificar con clorhídrico concentrado. Color azul indica HCN. Si aparece color verde suave agregar gotas de ácido fosfórico. Si aún no se observa color azul, se puede aumentar la sensibilidad de la reacción y agregar gotas de solución de cloruro de bario al 10% y dejar reposar unas horas. Si se observan puntos azules sobre fondo blanco, indica presencia de HCN.

Las reacciones correspondientes son las siguientes:



Se agrega HCl y se agita:



Se intensifica con H_3PO_4 o Cl_2Ba , pues forman sales insolubles de SO_4Ba que sedimentan arrastrando el Azul de Prusia al fondo del tubo, donde se observará un botón blanco azulado.

La sensibilidad de la reacción es de hasta 10 μg de ión cianuro. Con el agregado de cloruro de bario se puede revelar hasta 5 μg de ión cianuro.

4.1.4.3 Reacción sulfocianica o de Von Liebig.

El método consiste en el agregado de un exceso de polisulfuro al destilado y posterior calentamiento para formar sulfocianuro. Luego se acidifica la solución formándose ácido sulfocianhídrico que con cloruro férrico aparece color rojo.

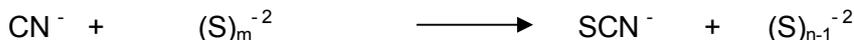
Reactivos

- Solución de sulfuro de amonio amarillo (polisulfuro).
- Acido clorhídrico concentrado.
- Solución rojo Congo.
- Solución acuosa de cloruro férrico al 0,5%.
- Eter etílico.

Procedimiento

Unos 5 ml de destilado se colocan en una cápsula de porcelana y se agregan unas gotas de polisulfuro de amonio (amarillo). Se procede calentando suavemente durante 5 minutos sobre tela metálica, agitando el líquido con varilla y agregando sulfurente a medida que la solución se decolora. Cuando el contenido se haya concentrado (1 ml) y se observe persistencia de color amarillo se considera prácticamente realizada la transferencia en sulfocianuro. Se deja enfriar y se acidifica con solución concentrada de HCl hasta reacción ácida frente al rojo congo. El compuesto puede aislarse por tratamiento con éter etílico realizando tres extracciones con 20, 10 y 10 ml de éter cada una. Los extractos etéreos se evaporan en cápsula de porcelana y dejar evaporar el éter a temperatura ambiente. Luego se trata el residuo con 2 o 3 gotas de cloruro férrico al 0.5% y

aparece color rojo intenso de intensidad variable (50 µg de HCN transformado en SCN⁻ el color aparece rápidamente)

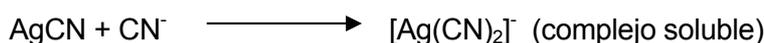


El ensayo es altamente sensible y específico. Algunos autores estiman que es posible revelar ión cianuro en la proporción de 100 µg/L.

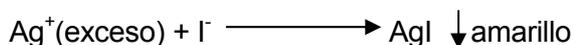
4.1.5 Ensayos cuantitativos.

4.1.5.1 Método de Denigés.

Constituye una valoración en donde se forma una sal estable de AgCN y el exceso de Ag⁺ en el punto final forma un compuesto de color amarillo con el ión yoduro de acuerdo con las siguientes reacciones. Este procedimiento es apto para concentraciones elevadas.



Se corrige con NH₃



Reactivos

- Amoníaco concentrado.
- Yoduro de potasio al 10%.
- Solución de nitrato de plata 0,01N.

Procedimiento.

Tomar 10 ml de destilado y agregar 10 ml de amoníaco concentrado y 1 ml de KI al 10%. Titular con solución de nitrato de plata 0.01N hasta aparición de turbiedad permanente.

Cálculos = 1 ml de NO₃Ag (0.01 N) = 5.4 · 10⁻⁴ gr HCN = 0.54 mgr de HCN.

4.1.5.2 Determinación de cianuro en alimentos, sangre e hígado. Método de formación de manchas de azul de prusia.

El método se fundamenta en que el cianuro de la muestra es liberado por acción del ácido sulfúrico o ácido tricloroacético y aspirado a través de un disco de papel impregnado en sulfato ferroso dentro de un flange y se forma ion férrico visualizado como manchas de ferrocianuro ferrico (azul de Prusia). El disco es luego sumergido en ácido clorhídrico hasta que toda la porción sin

reaccionar sea eliminada. La intensidad de la mancha es proporcional a la cantidad de cianuro presente en la muestra.

Reactivos.

- β glucosidasa.
- Agente antiespumante.
- Solución acuosa al 11% de cloruro férrico: pesar 11g de cloruro férrico y llevar a 100 ml con agua destilada.
- Solución acuosa de sulfato ferroso amónico al 19%: pesar 19 g de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ y llevar a 100 ml con agua destilada.
- Solución acuosa al 10% de hidróxido de sodio: pesar 10 g de NaOH y llevar a 100 ml con agua destilada.
- Solución acuosa de 1N de hidróxido de sodio: pesar 40 g de NaOH y llevar a 1000 ml con agua destilada.
- Solución stock de cianhídrico (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$): pesar 0,2503 g de cianuro de potasio y transferir en un matraz de 100 ml agregar 10 ml de NaOH 1N y diluir al volumen con agua destilada.
- Solución standard intermedia de cianhídrico (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$): diluir 1 ml de la solución stock de cianhídrico en 10 ml de agua destilada. Preparar diariamente.
- Solución de trabajo de cianhídrico (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$): diluir 5 ml de la solución intermedia standard de cianhídrico en 50 ml de agua destilada. Preparar diariamente.
- Solución acuosa al 20% de ácido sulfúrico: agregar 50 ml de agua a un frasco graduado de 100 ml. Agregar 20 ml de ácido sulfúrico concentrado y llevar al volumen con agua destilada.
- Solución de ácido clorhídrico 25%: agregar 50 ml de agua en una probeta de 100 ml, agregar 25 ml de HCl concentrado y llevar a volumen con agua destilada.
- Papel de filtro Watman N° 40 cortado en forma de discos 16 mm diámetro.

Aparatos y equipos.

- Aparato para cianhídrico
- Baño de agua a 75°C.
- Bomba de aire
- Baño de vapor o evaporador.

Procedimiento

Pretratamiento de alimentos.

1. Pesar cerca de 10 g de alimento y transferir a un homogeneizador
2. Agregar 200 ml de agua y 0,02g de β glucosidasa
3. Homogenizar durante 4 minutos.
4. Dejar decantar 1 hora.
5. Proceder al paso 10 del análisis.

Pretratamiento en muestras de sangre.

1. Agregar 300 ml de agua, 5 ml de sangre y 2 ml de antiespumante a un probeta de 500 ml.
2. Reemplace el tapón de goma en el aparato de cianhídrico con el tapón ajustado en la probeta de 500 ml.
3. Prepare suficiente cantidad de agua caliente (paso 5 del análisis) que pueda contener la probeta de 500 ml.

Procedimiento.

- 1) Agregar aproximadamente 20 ml de agua al tubo muestra. Pipetear 0,5 ml de solución standard de trabajo en el tubo.
 - 2) Agregar 20 μ l de cada uno de los siguientes reactivos FeCl_3 11%, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 19%, y NaOH 10% en el centro del papel de filtro de 16 mm de diámetro.
 - 3) Ubicar el papel de filtro en el aparato de cianhídrico mientras esté húmedo y ensamble el aparato.
 - 4) Agregar 1,0 ml de ácido sulfúrico/g de estándar con una jeringa a través de la entrada del tubo de aire al tubo muestra.
 - 5) Ubicar el tubo en baño de agua a 75°C.
 - 6) Aplicar succión durante 4 minutos. Menor tiempo de succión puede dar incompleta recuperación y mayor tiempo puede condensar agua arriba del disco.
 - 7) Revelar el papel con HCl al 25% caliente (en baño de vapor o en plancha calefactora) hasta que el papel es vea blanco con manchas azul.
 - 8) Enjuagar el disco con agua destilada y secar. Alinear las manchas standard en línea sobre un fondo blanco. Si las manchas son de color oscuro excesivo, puede deberse a sulfuros que tienden a desaparecer al ubicar el papel en HCl.
 - 9) Repetir los pasos 2-8 con standard de 10 μ g, 20 μ g y 50 μ g standard.
 - 10) Colocar una porción de la muestra homogeneizada (1-5g) estimando que contiene un total de 5 – 20 μ g de cianuro en el tubo muestra. Agregue 20 ml de agua al tubo de la muestra.
 - 11) Agregue 1ml de ácido sulfúrico por gramo de muestra. Como mínimo de 1 ml, pudiendo agregarse más volumen si la muestra es básica.
 - 12) Repetir los paso 5-8.
 - 13) Repetir el análisis de la muestra con un sobreagregado de 5 μ g.
 - 14) Puede usarse una comparación visual o cuantificar en un densitómetro.
 - 15) Construir la curva de calibración usando los standard de cianuro y determinar los niveles en la muestra por comparación de absorbancia. Informar en ppm.
- Consideraciones generales: Medir el pH del contenido estomacal. Si el pH es ácido, el ión cianuro es probable que se haya perdido.

- **Precauciones: Este método emplea soluciones de HCN siendo importante realizar esta preparación y manipuleo con sumo cuidado y siempre bajo campana de extracción de gases.**

4.1.5.3 Método de microdifusión de Feldstein-Klendshoj.

Fundamento.

En la cápsula de Conway el ácido cianhídrico difunde del compartimiento externo al interno siendo fijado como cianuro en la solución alcalina. Se toma una alícuota del compartimiento interno y se agrega cloramina T, formándose cloruro de cianógeno. Luego por el agregado de piridina se forma cloruro de cianopiridina.

La acción hidrolítica determina la apertura del anillo piridínico, para dar lugar a la formación del ácido glutacónico. Si este derivado se hace reaccionar con ácido barbitúrico se forma un complejo rojo que se lee a 580 nm.

Muestra: sangre entera con heparina, orina u homogenato de vísceras.

Reactivos.

- Hidróxido de sodio 0,1N
- Acido sulfúrico 10% en volumen

- Lubricante: a base de siliconas o mezclar 2 partes de vaselina sólida y 1 parte de parafina.
- Fosfato monosódico 1M.
- Cloramina T al 0,25%. Se guarda en heladera hasta el momento de usar.
- Reactivo piridina-barbitúrico: en un matraz aforado de 50 ml colocar 3 g. de ácido barbitúrico, 15 ml de piridina purísima y 3 ml de ácido clorhídrico concentrado. Mezclar hasta disolución total, llevar a volumen con agua destilada y filtrar.

Instrumental.

- Espectrofotómetro.
- Cubetas de sección cuadrada de 1 cm de paso de luz.
- Cámaras de Conway.

Procedimiento.

1. Colocar en el compartimiento interno de la unidad de microdifusión de Conway 3,3 ml de hidróxido de sodio 0,1N y en el compartimiento externo 2 a 4 ml de sangre total u orina, o 5 ml de homogenato de tejido (equivalente a 1 g de tejido). Como reactivo liberador se agregan 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico al 10% en el compartimiento externo.
2. Tapar inmediatamente y homogenizar por rotación. Sellar perfectamente las cámaras con vaselina. El tiempo de difusión es de 3 a 4 horas a temperatura ambiente.
3. Transcurrido el tiempo indicado se toma 1 ml de la solución alcalina del compartimiento interno y se coloca en un tubo de ensayo. Se prepara un blanco colocando en otro tubo 1 ml de hidróxido de sodio 0,1N. A cada tubo agregar 2 ml de fosato monosódico 1M y 1 ml de cloramina T al 0,25%. Mezclar y dejar en reposo 2 a 3 minutos, agregar por último 3 ml de reactivo piridina-barbitúrico, mezclar y dejar en reposo 10 minutos. En presencia de ión cianuro aparece color rosado cuya absorbancia se mide a 580 nm.

Se compara la absorbancia con testigos de cianuro en concentraciones comprendidas entre 0,1 a 2,0 g/ml de solución de hidróxido de sodio 0,1N.

4.1.6 Valores normales de cianuro en individuo adulto.

El cianuro aparece como producto del catabolismo normal en pequeñas cantidades. Hasta 15 $\mu\text{g}/100$ ml sangre es considerado como valor normal.

4.1.5 Interpretación de los resultados.

El valor de TWA es de 10 ppm (OSHA, MAK) mientras que ACGIH y NIOSG recomienda un valor de STEL de 4,7 ppm. En una intoxicación por inhalación de ácido cianhídrico valores mayores de 100 $\mu\text{g}/100$ ml suelen ser fatales pero puede variar de un individuo a otro.

La ingestión de 150- 200 mg de NaCN puede provocar la muerte en un individuo adulto de 70 Kg pudiendo llegar la concentración sanguínea a valores 1 –2 mg/100 ml o superiores.

En muestras de sangre cadavérica, el cianuro desaparece rápidamente por acción enzimática y bacteriana. Hasta 15 $\mu\text{g}/100$ ml de sangre en cianuro aparece como producto del catabolismo normal en pequeñas cantidades. En sangre, niveles de cianuro mayores de 1 mg/L es asociado con casos fatales.

Dosis tóxica: una concentración de 1 mg/Kg de peso corporal es mortal.

4.2 Tóxicos volátiles.

Se denominan tóxicos volátiles a todas aquellas sustancias que independientemente de su estado físico pueden separarse del material que las contiene a través de los siguientes métodos: destilación simple destilación por arrastre con vapor, microdifusión, espacio cabeza. Comprenden, entre otros, a compuestos tales como alcoholes primarios, aldehídos, cetonas, fenoles y solventes orgánicos como éter, cloroformo, tetracloruro de carbono, etc.

Es necesario tener en cuenta que los tóxicos volátiles al ingresar al organismo pueden sufrir una serie de modificaciones en su estructura de manera tal que, dichas sustancias pueden convertirse en metabolitos atóxicos o bien aumentar notablemente su toxicidad.

En los casos de intoxicaciones, para realizar la correspondiente investigación se emplea una alícuota acorde con el volumen total de la muestra recogida. En muestras destinadas a la peritación, generalmente se utiliza un octavo de la cantidad total de la muestra disponible. En las pericias se emplean vómitos, restos de medicamentos, alimentos, vísceras (estómago, hígado, bazo, riñones, cerebro), sangre u orina. Se procede entonces a tomar una porción reducida de ellos sobre la que se efectúan reacciones preliminares con papeles reactivos previo al aislamiento del o de los tóxicos, tratando de analizar la sección del tracto digestivo donde presumiblemente, se encuentre la mayor concentración de los sustancias de interés.

Las condiciones de recolección de las muestras deben contemplar no utilizar alcohol como antiséptico local ni otras soluciones constituidas por sustancias reductoras que puedan interferir en la determinación posterior. Se recomienda usar solución jabonosa o solución acuosa de bicloruro de mercurio 0,5%.

La conservación de las muestras requiere el empleo de recipientes de plástico con tapa hermética (no usar tapones de goma) conteniendo 2 - 5 mg de fluoruro de sodio (anticoagulante y conservador) o bien oxalato y citrato. Asimismo, se deben realizar rápidamente las determinaciones o en su defecto, someter a las mismas a un almacenamiento refrigerado a 4°C, sellando el recipiente y se deben tener contramuestras.

Es importante el aislamiento de dichos compuestos separables del material que lo contienen a través de los distintos métodos citados previamente, los cuales se desarrollarán a continuación. Posteriormente al aislamiento, se realiza la cuantificación de las sustancias en estudio mediante el empleo de diversas metodologías como cromatografía gaseosa (CG), cromatografía gaseosa de alta resolución (HRCG) con empleo de columnas capilares, métodos enzimáticos, métodos acoplados, etc.

4.2.1 Etanol.

4.2.1.1 Introducción.

Dentro de los tóxicos volátiles, los alcoholes Etanol y Metanol son sustancias de importancia toxicológica dada su acción farmacológica depresora del sistema nervioso central (SNC) y el abuso creciente del consumo de bebidas alcohólicas. Esto último presenta

importancia médico - social debido a que los individuos alcoholizados pueden ser causantes de trastornos y accidentes de los cuales son imputables.

Las vías de penetración posibles de los alcoholes son la digestiva, la respiratoria, y la absorción a través de la piel. En el caso del etanol, la intoxicación más frecuente ocurre cuando el individuo ingiere cantidades excesivas de esta sustancia por el consumo de bebidas alcohólicas fermentadas y/o destiladas.

Los tipos de muestras generalmente usados para estas determinaciones son: sangre (alcoholemia), orina, otros fluidos biológicos, vísceras, alimentos, etc. A continuación se describen los métodos de determinación de etanol mas frecuentemente empleados en un laboratorio de toxicología.

4.2.1.2 Determinación de etanol en sangre por el método de microdifusión.

La microdifusión se realiza en cámaras de Conway que poseen en el compartimiento externo muestra y agente liberador (CO_3K_2) y en el interno el agente atrapante $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$ 0,01N. En este caso, se produce la captación y oxidación del etanol hacia ácido acético, forzándose la remoción completa del primer compuesto al cabo de un tiempo y temperatura previamente determinados.

Las muestras sobre las que se utiliza esta técnica son sangre, orina, saliva y otros fluidos biológicos.

Reactivos

- Solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0.106 N en H_2SO_4 22,08 N (Pesar 5,2 gr de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en 400 ml de H_2O (d) y llevar a 1 L con H_2SO_4 (c).
- Solución saturada de K_2CO_3 .

Curva de calibración.

Soluciones de sangre con concentraciones conocidas de alcohol etílico: 0,25 g/L; 0,50 g/L, 1,0 g/L ; 2, 0 g/L ; 3,0 y 4.00 g/L.

Procedimiento.

Se colocan en el compartimiento interno de la cámara de Conway (tamaño pequeño), 0,5 ml de la solución ácida de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$. En un extremo del compartimiento externo, se agregan 0,2 ml de sangre y en el otro extremo del mismo 0,2 ml de la solución saturada de CO_3K_2 , Tapar la cámara y hacerla girar cuidadosamente (en forma horizontal) sobre la mesa de trabajo, para poner en contacto los reactivos colocados en el compartimiento externo.

Dejar difundir 1 hora a temperatura ambiente. Luego, destapar la cámara y recoger la solución del compartimiento interno.

Proceder a la lectura espectrofotométrica a 620 nm. En el caso de utilizar cámaras de Conway (tamaño grande) los volúmenes de los reactivos a utilizar serían los siguientes: 3 ml de la solución ácida de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$, 1 ml de sangre y 1 ml de la solución saturada de CO_3K_2 .

Resultados

Valores de alcoholemia superiores a 0,5 g/ L, tienen importancia médico-legal en nuestro país.

4.2.1.3 Determinación de etanol en sangre por el método de Cromatografía Gaseosa (CG) y Head Space.

A fin de proceder a la identificación y cuantificación de etanol en muestras de sangre se utiliza la cromatografía gaseosa, implementando la técnica del "head space" para separar los analitos de la matriz, previo a la inyección en el cromatógrafo.

Materiales y reactivos.

- a) Solución estándar de etanol al 10 gr/L .
- b) Sangre libre de etanol con agregado de la solución de etanol para alcanzar concentraciones de 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 g/L.
- c) Agente liberante: solución saturada de carbonato de potasio.
- d) Butanol 1 por mil en sangre no putrefacta .
- e) Viales de vidrio de 10 ml de capacidad, cerrados con tapón de goma y arandela de aluminio con sellador manual.

Condiciones del head-space (HP 7694E).

Incubación a 60°C de los viales cerrados durante 10 minutos, presurización carrier N₂ 14,4 psi, presión en vial 14,0 psi. Tiempo presurización: 0,2 min, tiempo loop: 0,01 min, tiempo inyección: 0,2 min. Temperatura loop: 102°C, temperatura líneal 100°C.

Condiciones cromatográficas (PE 8000)

Columna de vidrio empacada (1,80 m largo, diámetro externo 1/8 de pulgada con relleno de Carbowax 1500 al 0,2% fase estacionaria soporte: Graphapac GC malla 60/80, temperatura columna 100°C, detector de ionización de llama (temperatura = 150°C), temperatura de inyección = 150°C. Tiempo de retención etanol: 2.31 min, tiempo de retención standard interno: 4.88.

Elaboración de la curva patrón

Se preparan viales con 1 ml de sangre con agregado de la solución tipo de etanol para alcanzar concentraciones de 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 g/L. Se agregan a cada uno 0.5 ml de solución del patrón interno y 1 ml de la solución del agente liberador. Se tapan herméticamente.

A partir del cromatograma resultante se obtienen las áreas bajo la curva del etanol y del patrón interno. Se grafica concentración de etanol en sangre vs. $A_{\text{EtOH}}/A_{\text{PI}}$, en donde A_{EtOH} es el área bajo la curva del pico de etanol y A_{PI} es el área bajo la curva del patrón interno.

Procedimiento

Se prepara un vial de 10 ml con 1 ml de sangre a analizar, 1 ml de la solución del standard interno y 1 ml del agente liberador, agregados en ese orden. Se sella rápidamente el vial para su disposición en el equipo.

Los cálculos se realizan por interpolación a partir de los datos obtenidos para la curva patrón, considerando siempre la relación $A_{\text{EtOH}} / A_{\text{S}}$. Se expresan los resultados en gramos de etanol/l de sangre o en mg/100 ml.

4.2.1.4 Determinación de etanol en sangre por métodos bioquímicos.

Los métodos bioquímicos permiten la dosificación del alcohol en la sangre u otros fluidos biológicos a efectos de inferir la impregnación alcohólica del organismo. Entre ellos se encuentran los métodos enzimáticos (método de la alcohol deshidrogenasa ADH) y métodos acoplados (enzimático – electroquímicos) (biosensores).

Método-Enzimático /UV.

Fundamento.

El etanol es oxidado a acetaldehído en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) por nicotinamida / adenina dinucleótido (NAD).



El acetaldehído formado puede ser desplazado totalmente hacia la derecha en condiciones alcalinas atrapando el acetaldehído formado.

El acetaldehído es oxidado en presencia de aldehído deshidrogenasa (Al-DH) cuantitativamente a ácido acético



NADH es determinado por la medida de su absorbancia a 334, 340 ó 345 nm.

Ensayo.

- 100 ml de buffer difosfato de potasio pH 9
- 30 tabletas, cada tableta contiene NAD 4 mg, aldehído deshidrogenasa estabilizada.
- 1,5 ml de suspensión ADH de 7000 U. Etanol estándar: usar sin diluir. Se utiliza para el control del proceso.

Se preparan de las soluciones según las indicaciones del fabricante.

Condiciones de trabajo.

- Longitud de onda 340nm ó 365 nm ó 334 nm
- Cubetas de vidrio: 1 cm paso óptico
- Temperatura > 20 / 25°C
- Volumen final: 3,15 ml. Leer contra aire (sin cubeta en el paso de luz, contra agua o contra blanco (cuando se usa fotómetro de doble haz).
- Solución de muestra: 0.3 - 12 μl etanol /cubeta (en 0,100-0,500 ml de volumen de muestra)

Procedimiento

Pipetear en la cubeta	blanco	
Reacción mezcla	3,000 ml	3,000 ml
Agua redestilada	0,100 ml	-----
Solución muestra	-----	0,100 ml

Mezclar aproximadamente 3 minutos y leer la absorbancia de la solución (A_1)

Solución 3	0,050 ml	0,050 ml
------------	----------	----------

Mezclar, después de completa reacción (5 a 10 minutos) leer la absorbancia de la solución inmediatamente una después de la otra. (A_2)

Es absolutamente necesario tapar la cubeta con parafilm durante la medida

Determinar la diferencia de absorbancia ($A_2 - A_1$) para ambos, blanco muestra.

$$A = (A_2 - A_1) \text{ muestra} - (A_2 - A_1) \text{ blanco}$$

Las medidas de absorbancia deben arrojar como regla, una diferencia de al menos 0,100 unidades de absorbancia para obtener resultados suficientemente precisos.

Cálculos

De acuerdo a la ecuación general para calcular la concentración en la reacción en la cual la cantidad de NADH formado es estequiométricamente igual a la mitad de la cantidad de sustrato:

$$C(\text{g/L}) = \frac{V \cdot \text{PM} \cdot \Delta A}{E \cdot d \cdot v \cdot 2 \cdot 1000}$$

V : volumen final, 3.150 ml.

v : volumen de muestra, 0.100 ml

PM: peso molecular del etanol (g/mol). 46.07

d : paso óptico, 1.00 cm

E : coeficiente de extinción molar del NADH

340 nm: 6.3 (l.mol⁻¹. cm)

365nm: 3.4 (l.mol⁻¹. cm)

334 nm: 6.18 (l.mol⁻¹. cm)

Si la muestra ha sido diluida considerar aplicar a los resultados el correspondiente factor de dilución

Sí se analiza un sólido y/o muestra semisólida, la cual es pesada para la preparación, los resultados se expresan por cantidad de muestra pesada.

$$\text{contenido etanol} = \frac{[\text{etanol}] (\text{g/l sol. muestra}) \times 100}{\text{peso muestra (g/l sol. muestra)}} \quad (\text{g/100})$$

4.2.1.5 Interpretación de resultados.

La relación entre alcoholemia y los efectos farmacológicos producidos presenta variaciones según factores individuales tales como edad, hábito, sexo, etc.

Dada su acción farmacológica depresora del sistema nervioso central (SNC), el etanol produce una parálisis descendente del mismo, luego la depresión continúa sobre los centros subcorticales y el cerebelo, después sobre la médula espinal y finalmente sobre el bulbo, con depresión de los centros vitales, respiratorio y vasomotor llevando a la muerte al individuo.

La acción farmacológica del etanol comprende 4 períodos, cuyas manifestaciones están en relación con su concentración en sangre (alcoholemia).

Período I: (50 - 150) mg/100 cm³ sangre. Alteraciones funcionales de la corteza cerebral (memoria, atención, asociación de ideas están perturbadas). Liberación del tono emocional, malhumor, exceso de confianza.

Período II: (150 - 250) mg/100 cm³ sangre. Ebriedad manifiesta. Trastornos de la palabra, postura y marcha, pérdida de la coordinación, depresión de los centros posturales, incluyendo el cerebelo.

Período III: (250 - 350) mg/100 cm³ sangre. Sueño profundo, inconsciencia, estupor, coma. Se afectan los centros espinales.

Período IV: (350 - 450) mg/100 cm³ sangre. Depresión de centros bulbares, vasomotor, respiratorio. Existe peligro de muerte. Coma profundo. Piel húmeda y fría, pulso acelerado, pupilas dilatadas y respiraciones lentas. La muerte se produce por parálisis respiratoria principalmente con concentraciones mayores a 500 mg/100 cm³ sangre.

El alcohol produce o constituye un caso típico de Toxicomanía (dependencia física, psíquica y tolerancia).

Desde el punto de vista forense interesa su cuantificación a efectos de aplicarse cuando corresponda la determinación de alcoholemia retrospectiva.

4.2.1.6 Curvas de absorción-eliminación de etanol en sangre y Cálculos de Alcoholemia Retrospectiva.

Widmark en 1932 había enunciado que el metabolismo del alcohol transcurría a velocidad constante, pero lentamente; modificando el concepto vertido por Nicloux en el cual la metabolización del etanol era independiente de la concentración. Widmark había además calculado que la velocidad de metabolización era de 0,15 gramos de alcohol por litro de sangre y hora (Abel J.C, 1934).

El alcohol contenido en las bebidas alcohólicas se absorbe preferentemente por el yeyuno ileon, alcanzando en breve el torrente sanguíneo dada su fácil difusión por las membranas biológicas. La ingestión anterior o simultánea de alimentos sólidos hace más lenta la absorción y el ayuno la acelera. La desintoxicación bioquímica es progresiva y dura aproximadamente unas 18 horas. El ritmo de eliminación depende del coeficiente de etiloxidación, que expresa la cantidad de alcohol eliminado por minuto y por kilogramo de peso en un sujeto dado, cualquiera sea su concentración: este coeficiente es llamado "constante β de Widmark". La figura 4.3 ilustra una curva típica de absorción - eliminación, mediante las

determinaciones de etanol en sangre (alcoholemia) y el tiempo transcurrido desde el acto de ingesta.

La primer parte indica una alcoholemia ascendente, que se manifiesta en la etapa de absorción de alcohol desde el tracto gastrointestinal a la sangre. Si la absorción es rápida (como sucede con las bebidas de alta graduación alcohólica o libación en estado de ayunas) la curva de absorción semejará más una vertical (línea trazos cortados). Caso contrario, por ejemplo cuando se encuentran alimentos en el estómago al momento de la libación, poseerá menor pendiente (línea de puntos). La zona de meseta indica un equilibrio entre el ingreso por difusión y eliminación oxidativa.

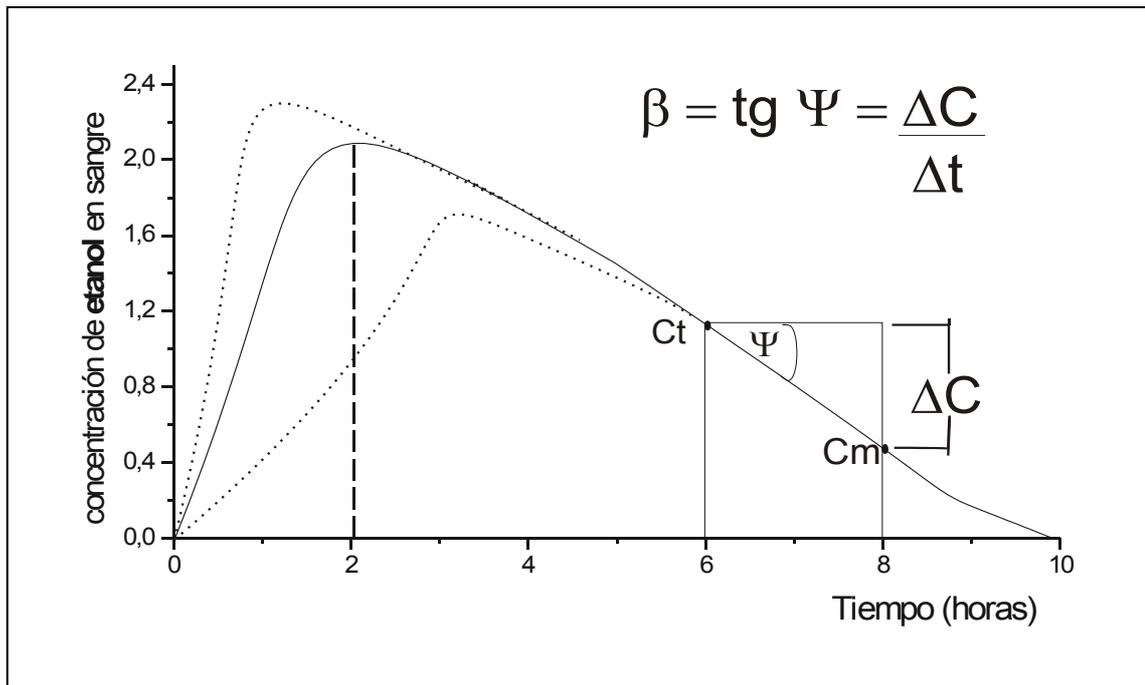


Fig. 4.3: Curva de alcoholemia.

Prolongando la recta hacia la ordenada observamos la concentración correspondiente a C_0 , correspondiente a la alcoholemia máxima teórica, suponiendo absorción inmediata y total de todo el etanol. Este valor debería ser igual a la dosis de alcohol tomada por g de peso del individuo. Pero, experimentalmente se comprobó que esto no sucede, sino que la relación D/C_0 es 0,7 para el hombre y 0,6 para la mujer, debido a la desigual distribución del etanol en los diferentes tejidos corporales. Esta relación D/C_0 suele referirse como Volumen de Distribución.

El coeficiente β (en el gráfico) puede obtenerse mediante la relación: $\Delta C / \Delta t$, es decir, $\beta = \Delta C / \Delta t$. La importancia del coeficiente β radica en que permite efectuar cálculos retrógrados de alcoholemia y determinar el alcohol ingerido por un individuo. El Profesor Repetto considera que para aplicar los cálculos de alcoholemia retrospectiva, conforme al espíritu del Derecho y no perjudicar al acusado se puede tomar el valor mínimo de $\beta = 0,1$ gr por mil, si esta expresado en horas; o bien 0.002, si esta expresado en minutos.

En un principio se creyó que β era constante, pero con el tiempo, los estudios experimentales arrojaron nueva luz, en relación a la verdadera cinética que presenta el alcohol etílico. Hoy se admite que los ejercicios, sudoración, concentración de alcohol que se alcanza en sangre y habituación, lesiones hepáticas y renales, entre otros factores, pueden variar el valor de la constante β .

Es importante tener en cuenta que los cálculos en que involucramos β , sólo tienen validez en la etapa de eliminación, es decir, en la rama descendente de la curva absorción - eliminación. Existen discrepancias entre los autores sobre la exactitud de los cálculos retrospectivos. Algunos indican que los numerosos factores que influyen en β , no proporcionan datos fidedignos para aplicarlos matemáticamente con exactitud. En cambio otros apoyan la validez del cálculo pero advierten la necesidad de efectuar dos determinaciones de alcoholemia, sucesivas, para asegurar que se está en la etapa neta de eliminación.

Antes de entrar en las expresiones matemáticas y los procedimientos que se realizan para obtener el resultado de una alcoholemia un tiempo " t " anterior a la toma de muestra, cabe señalar que en realidad la eliminación no sigue una cinética lineal de orden "0" o lineal sino solo para concentraciones de etanol en sangre superior a 0,5 g/l de alcohol etílico. En el rango indicado, es decir, para alcoholemias bajas, la cinética es un proceso exponencial o cinética de Michaelis- Menten . En el primer caso, por saturación del sistema ADH-NAD, la ecuación viene dada por:

$$C_t = C_m - kt$$

En el segundo,

$$-dC / dt = V_{m\acute{a}x} \cdot C \cdot (K_m + C)$$

siendo C_t : alcoholemia al tiempo t, con C_m : alcoholemia máxima y, K_m : Constante de Michaelis, que oscila entre 2 y 2.4 mM. En juicios por homicidio, lesiones graves, etc. el magistrado y ahora en nuestra provincia, también el Fiscal (dirige la investigación preliminar preparatoria antes de su elevación a juicio) suele requerir del Perito el cálculo de alcoholemia retrospectiva al momento del hecho. Esto evidentemente por una circunstancia que se da con mucha frecuencia: el imputado es detenido varias horas después del hecho delictivo por lo que las muestras sanguíneas no reflejarán el tenor real de alcohol al momento del hecho.

Si la alcoholemia supera el valor de 1 por mil, bien puede simplificarse el cálculo aplicando la ecuación correspondiente a una eliminación de orden "0", es decir, lineal. Si observamos la curva de eliminación podemos aplicar el concepto geométrico de la tangente del ángulo ψ (cateto opuesto / cateto adyacente) es decir:

$$\frac{C_t - C_m}{t_2 - t_1} = \text{tg } \psi = \beta$$

despejando:

$$C_t = C_m + \beta \cdot t$$

siendo C_t : alcoholemia en el momento del hecho, C_m : alcoholemia en el momento de la toma de muestra y t: tiempo transcurrido desde el momento del hecho al de la toma de muestra ($t_2 - t_1$).

Respecto de la cantidad de alcohol "A" en el organismo al momento del hecho:

$$A = C_t \cdot P \cdot r$$

siendo P: peso del individuo, r: constante que relaciona la concentración de etanol en el cuerpo / concentración en sangre. Sustituyendo en la ecuación la expresión correspondiente a C_t , hallada más arriba :

$$A = (C_m + \beta \cdot t) \cdot P \cdot r$$

A continuación, mediante un ejemplo hipotético, procederemos a calcular la alcoholemia retrospectiva y la cantidad de alcohol en el cuerpo, que nos permitirá inferir cuanta bebida alcohólica de una graduación determinada pudo haber tenido el imputado en el momento del hecho delictivo.

Supongamos que se trata de un caso de Lesiones graves. El imputado es detenido y la muestra sanguínea extraída seis horas después del hecho. El informe de Laboratorio arroja el siguiente valor: 1,2 gr de alcohol etílico por 1000 ml de sangre. Aplicando la fórmula para obtener la alcoholemia en un tiempo t de seis horas:

$$C_t = C_m + \beta \cdot t$$

C_m : en gr. / 1000

β : 0,0025 en gr / min. Kg

t: tiempo en minutos.

$$C_t = 1,20 + 0,0025 \cdot 360$$

$$C_t = 1,20 + 0,90$$

$$C_t = 2,10 \text{ gr por } 1000 \text{ gr de sangre}$$

Este valor de 2,10 gr por 1000 será la alcoholemia teórica en el momento del hecho, si aseguramos que estamos en la etapa de eliminación, mediante una segunda extracción sanguínea a la hora aproximadamente. Si ahora aplicamos la ecuación para A (cantidad de alcohol), sabiendo que el imputado pesa 70 Kg y posee una constitución atlética ($r = 0.67$):

$$A_t = 2,10 \cdot 70 \cdot 0,67$$

$$A_t = 98,49 \text{ gramos de alcohol etílico absoluto o } 123 \text{ ml (pasando a ml por la densidad de Etanol } = 0,8)$$

Este último dato es interesante cuando queremos referir la cantidad de bebida que supuestamente habría ingerido. Si se tratara de vino (considerando una graduación para vinos de 10 grados) implica que debió haber ingerido 1,230 ml, es decir casi una botella y cuarto de vino común. Debe recordarse que el modelo es aproximado, algunos autores han expresado que el error con que se trabaja en la práctica es de +/-20%. No obstante si la alcoholemia es superior a 1.5 gr / 1000, a los efectos de la interpretación, el guarismo no será controvertido.

4.2.1.7 Factores involucrados en la pérdida y generación de Etanol en tejidos y humores humanos.

En todas las estimaciones y cálculos de alcoholemia, hay que considerar las pérdidas de etanol que pueden operarse por la indebida preservación de la sangre. Se ha podido comprobar, que las mayores pérdidas se deben a la existencia de una importante cámara de aire entre la muestra contenida en el recipiente y la capacidad de éste. Es decir, matrices hemáticas escasas en recipientes de gran volumen, pierden etanol por evaporación.

En la actualidad, un respetable número de publicaciones indican que las pérdidas de etanol con el transcurrir de días, incluso semanas, no son relevantes, si las muestras son convenientemente extraídas y colocadas en recipientes adecuados y bien sellados. El uso de sustancias como preservantes (v.g: fluoruro de sodio) en sangre de individuos vivos no mejora mucho los resultados, más aún si la muestra fue tomada con jeringa estéril y mantenida a bajas temperaturas. En estas condiciones las sangres de personas vivas pueden analizarse aún después de dos semanas sin variaciones apreciables respecto de la alcoholemia que se hubiera obtenido en el primer día.

Winek (1996), efectuó estudios en muestras de sangre entera y suero que habían sido mantenidas por varias semanas a temperaturas bajas y altas, notando que las muestras resguardadas a temperatura más alta, mostraban pérdidas significativas a partir de treinta días y particularmente en las de sangre entera, no observando pérdida considerable en muestras de suero.

En relación a la producción de alcohol etílico post-mortem, O'Neal & Poklis (1996) observan que existen unas 58 especies de bacterias que son capaces de producir alcohol in vivo e in vitro. Si bien es cierto que la preservación de las muestras a temperaturas inferiores a los 4°C y la incorporación de Fluoruro de Sodio inhiben la producción de etanol de la mayoría de las bacterias no sucede así con la levadura *Candida albicans*, que ha demostrado ser una importante especie productora de alcohol.

Muchos productos volátiles han sido reportados como producidos por fenómenos postmortales (n-propanol, butanol, feniletanol, etc) por lo que se deberá poner especial atención en el estandar interno utilizado en los métodos de valoración por cromatografía gaseosa. Sería deseable la utilización de t-butanol, por ser un compuesto no generado en los fenómenos postmortales.

Algunos autores opinan que no debería informarse alcoholemias postmortem inferiores a 0,3 g/L con el objeto de evitar conclusiones sujetas a discusiones controvertidas sobre el origen del Etanol hallado.

Por otro lado, Garriot (1996) consigna que los procesos putrefactivos que generan Etanol llevan entre 3 y 10 días en desarrollarse. Cuando los valores hallados son superiores a 1,5 g/L y habiendo mantenido las muestras en condiciones apropiadas de resguardo, puede tenerse una mayor certeza que el alcohol detectado provenga de una ingesta.

Hoy día se esta considerando al humor vítreo, como matriz complementaria o bien suplementaria, cuando no se dispone de sangre o esta posee un alto grado de putrefacción.

Por otro lado los controles de calidad son aconsejables y una forma de validar los resultados emitidos. En éste sentido, el ejercicio de intercomparación de Etanol que se realiza

anualmente y por períodos de tres meses en el Instituto Nacional de Toxicología de España, nos ha resultado útil para evaluar la calidad de trabajo en nuestro Centro.

4.2.3 Metanol.

4.2.3.1 Introducción.

El metanol es el principal componente del destilado destructivo de la madera. Es uno de los disolventes más universales y encuentra aplicación, tanto en el campo industrial como en diversos productos de uso doméstico. Dentro de los productos que lo pueden contener se encuentra el denominado “alcohol de quemar” constituido por alcoholes metílico y etílico, solvente en barnices, tintura de zapatos, limpiavidrios, líquido anticongelante, solvente para lacas etc. Además, los combustibles sólidos envasados también contienen metanol.

Este alcohol se utiliza también para desnaturalizar soluciones de alcohol etílico, lo que ha dado lugar a numerosas intoxicaciones de carácter masivo dado el uso fraudulento de estas mezclas en bebidas alcohólicas.

La fermentación de jugos azucarados implementada para la obtención de bebidas alcohólicas, además de etanol, produce también cantidades variables de metanol y otros compuestos volátiles. El contenido de metanol en vino tinto es de 43-122 mg metanol/L, en vino blanco 38-118 mg/mL, en brandy 1500 mg/L, en whisky 1000 mg/L y en ron 800 mg/L.

La intoxicación por metanol ocurre entonces frecuentemente por vía digestiva en el caso de bebidas alcohólicas adulteradas con alcohol desnaturalizado o por vía respiratoria, digestiva o a través de la piel intacta en el caso de exposición en ambientes laborales, desde donde se pueden originar intoxicaciones graves y aún mortales. El o los individuos pueden sobrevivir dejando como secuela la ceguera irreversible pues la retina, es el sitio de manifestación de la toxicidad del metanol.

La mayor parte de los métodos usados en la determinación de metanol se basan en su oxidación a formaldehído y la posterior determinación de éste último.

4.2.3.2 Muestras.

En general se trabaja con sangre de pacientes intoxicados con metanol o bien con sangre cadavérica de personas fallecidas por intoxicación metanólica. El método se puede aplicar también tanto a otros fluidos biológicos como a homogenatos de vísceras.

Sangre: no se debe usar alcohol como antiséptico, se recomienda cloruro mercuríco al 0,5%. Usar fluoruro de sodio 1% como anticoagulante para inhibir el desarrollo microbiano dado que al inhibir la glicólisis se evita la formación de sustancias oxidantes que podrían actuar sobre el metanol. Tampoco debe usarse EDTA ni heparina. Transvasar a un tubo plástico, llenar completamente el tubo y cerrar. Conservar en heladera (4°C).

Orina, Líquido Cefalorraquídeo: recoger sobre fluoruro de sodio 1%. Conservar en heladera a 4°C en recipiente similar al de la muestra de sangre.

Investigación.

La mayor parte de los métodos usados en la determinación de metanol se basan en su oxidación a formaldehído y una posterior determinación de este último. Para evitar interferencias se trabaja con destilados de las muestras.

4.2.3.3 Identificación de metanol en fluidos biológicos.

4.2.3.3.1 Técnica del ácido cromotrópico.

Sobre 2 ml de destilado se agrega gota a gota permanganato de potasio 5% acidificado hasta color rosado (ligero exceso). Agitar y esperar diez minutos.

Decolorar con ácido oxálico al 10%. Esperar unos minutos.

Agregar 0,2 ml de ácido cromotrópico al 0,5% en solución acuosa. Luego agregar 2 ml de ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo. Un anillo de separación púrpura indica presencia de alcohol metílico. Calentar a 60°C.

Interferencias: gliceraldehído, arabinosa, fructosa y sacarosa dan un color amarillo para la reacción. Concentraciones considerables de furfural dan lugar a la aparición de un color rojizo.

Cuantificación de metanol.

Técnica

Reactivos.

Solución patrón de metanol : 0,801 g/ml

Permanganato de potasio al 5%.

Bisulfito de sodio solución saturada

Acido cromotrópico al 0,5%.

Acido sulfúrico concentrado

Equipos.

Espectrofotómetro visible

Procedimiento.

La solución patrón de metanol, se prepara tomando 0,25 ml de metanol (concentración: 0,801 g/ml) y llevando a 100 ml con agua destilada. De este modo, se obtiene una solución de 2000 γ /ml. Luego, mediante una dilución 1/10 se obtiene la solución tipo requerida de 200 γ /ml.

A partir de la solución tipo de metanol, se preparan soluciones patrón de metanol de las siguientes concentraciones: 200, 150, 100, 50 y 25 γ /ml, empleándose alrededor de 10 ml de cada una. Se dispondrá también de 10 ml de agua destilada, la cual se utilizará como blanco.

Metanol (200 γ /ml)	Agua destilada	Dilución	Concentración final
2,5 ml	7,5 ml	$\frac{1}{4}$	50 γ /ml
5,0 ml	5,0 ml	$\frac{1}{2}$	100 γ /ml
7,5 ml	2,5 ml	$\frac{3}{4}$	150 γ /ml

Reacción Colorimétrica:

Colocar 0,5 ml de destilado en un tubo de ensayo. Agregar una gota de permanganato de potasio al 5%. Dejar en reposo 10 minutos, agregar una gota de solución saturada de bisulfito de sodio para decolorar. Luego, añadir 0.1 ml de ácido cromotrópico al 0,5%. Colocar el tubo en un baño de hielo y agregar agitando 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Colocar el tubo en baño de agua a ebullición durante 15 minutos, enfriar y diluir con agua a un volumen de 5 ml empleando el baño de hielo.

Proceder en forma equivalente y simultánea con los patrones. Leer en el espectrofotómetro a 580 nm contra el blanco.

Expresión de los resultados: en mg/l de sangre ó en μ /ml de sangre.

4.2.3.3.2 Método del reactivo de Schiff.

Reactivos.

- Etanol 96°
- Solución patrón de metanol : 0,801 g/ml
- Permanganato de potasio al 5%.
- Acido Oxálico 10%
- Reactivo de Schiff
- Acido sulfúrico concentrado.

A 4 ml de destilados se agregan 2 ml de etanol, 2 ml de permanganato de potasio al 5% y 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Dejar 10 minutos.

Agregar luego 2 ml de ácido oxálico al 10%, dejando reposar otros 5 minutos.

Agregar 4 ml del reactivo de Schiff y mezclar. Al cabo de 1 hora medir a 510 nm. Se realiza una curva de calibración con soluciones de concentración conocida de metanol en forma similar a lo descrito anteriormente.

Interferencias: cuerpos cetónicos arrojan resultados falsos positivos.

Interpretación de resultados: Una concentración de 80 mg/100 ml (800 gamas/ml) es peligrosa para la vida. Conversión de unidades: 1gramo = 10^6 gammas.

4.2.3.3.3 Cuantificación de metanol mediante CG/ head space.

Muestras: sangre, vísceras, bebidas alcohólicas

Preparación de las muestras:

A partir de 1 ml de sangre, 1 g de vísceras o bien 1 ml de la bebida a investigar, se adiciona 1 ml de solución saturada de CO_3K_2 y 1 ml de alcohol isopropílico al 1%, éste último como standard interno. Las muestras se colocan en viales de vidrio con tapas de goma, los cuales son sellados. Se realiza una primera incubación a 30°C durante 30 min. y luego un

segundo tratamiento a 60°C por 45 min. A continuación, se procede a la inyección de 0.4 – 0.6 ml de la cámara de aire empleando jeringas descartables (Edge Needle – PC5100).

Equipo y condiciones operativas:

Cromatógrafo gaseoso Shimadzu GC 14 o similar; columna de de acero (2m longitud, 3mm diámetro interno), relleno 0.3% carbowax 1500- graphapack 60/80 (EMQ – All Tech), régimen isotérmico a 100°C, detector de ionización de llama conectado a a un integrador Chromatopac Shimadzu C-R4A. La temperatura de inyector y del detector es de 150°C, el gas carrier N₂ a flujo constante (40ml / min) siendo la presión de aire y de H₂ en el detector de 5 psi. El equipo debe ser calibrado mediante la obtención de una curva de calibración a partir de soluciones standard de metanol en el rango 0 – 4 g‰.

Preparación de las muestras:

Su investigación se realiza previa transformación en formiato de metilo de acuerdo a Abolin y col. (1980).

En este caso, 500 µl de sangre ó 0.5 g de tejido se colocan en un tubo con 250 µl de H₂SO₄ (c). Dicho tubo es sellado con un film, agitado, incubado durante 20 minutos y enfriado a temperatura ambiente evitando el contacto del ácido con el film. Luego se agregan 15 µl de acetonitrilo como standard interno y 15 µl de metanol. Luego de su mezcla, la preparación es incubada con agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, 0.4 – 0.6 ml de la respectiva cámara de aire son inyectados en el cromatógrafo gaseoso.

Equipo y condiciones operativas:

Se requiere un equipamiento similar al descrito para la determinación cromatográfica de metanol, excepto Columna Columnax megabore DB – WAX, J y W 30 m longitud, 0.53 mm diámetro interno; temperatura inicial 35°C, 1 min. gradiente 10°C/ min hasta 100°C.

4.2.3.3.4 Determinación de ácido fórmico.

Preparación de las muestras.

Su investigación se realiza previa transformación en formiato de metilo de acuerdo a Abolin y col. (1980) modificado.

En este caso, 500 µl de sangre ó 0,5 g de tejido se colocan en un tubo con 250 µl de H₂SO₄ (c). Dicho tubo es sellado con un film, agitado, incubado durante 20 minutos y enfriado a temperatura ambiente evitando el contacto del ácido con el film. Luego se agregan 15 µl de acetonitrilo como standard interno y 15 µl de metanol. Luego de su mezcla, la preparación es incubada con agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, 0,4 – 0,6 ml de la respectiva cámara de aire son inyectados en el cromatógrafo gaseoso.

Equipo y condiciones operativas.

Se requiere un equipamiento similar al descrito para la determinación cromatográfica de metanol, excepto Columna Columnax megabore DB – WAX, J y W 30 m longitud, 0.53 mm diámetro interno; temperatura inicial 35°C, 1 min. gradiente 10°C/ min hasta 100°C. Estas condiciones permiten mejor resolución de la señal en el cromatógrafo gaseoso respecto de las obtenidas en el trabajo de Abolin y col (1980).

4.2.4 Glicoles.

Desde el punto de vista químico son dioles, siendo el más conocido el etilenglicol o 1-2 etanodiol. Presenta un peso molecular de 62,07; punto de ebullición: 197,4 °C y densidad: 1,11 g/L. Se prepara por hidrólisis del óxido de etileno con ácido sulfúrico diluido en agua a 200 °C. Se lo separa por destilación siendo los subproductos dietilenglicol y trietilenglicol de interés debido a su toxicidad.

Este tipo de sustancias es comúnmente utilizada como solvente a nivel industrial como líquido anticongelante para radiadores, como líquido refrigerante para motores de aviones en adhesivos y en la síntesis de fibras poliéster. Se polimeriza en agua dando poliglicoles utilizados como disolventes en barnices y medicamentos. Por otra parte, el dietilenglicol (DEG) es un aditivo ilícito en vinos dulces.

Se han registrado muy pocos casos de intoxicación con etiología suicida o accidental a nivel doméstico a nivel mundial, salvo episodios a nivel masivo en EEUU y Nigeria y recientemente en Argentina en 1992, por consumo de jarabe de propóleo, una epidemia que afectó alrededor de 50 personas con 29 casos fatales caracterizada por la falla a nivel renal con oliguria seguida de anuria 24 – 48 hs. más tarde. Otros síntomas registrados consistían en náuseas, vómitos, cefaleas con daño a nivel hepático con altos niveles en sus enzimas (GPT, GOT, gamma-GT y LDH) y acidosis metabólica.

4.2.4.1 Investigación de Dietilenglicol (DEG).

Muestras: sangre, vísceras, jarabe de propóleo

Ensayo en jarabe de propóleo.

Muestras de jarabe de propóleo son diluidas con metanol (1:10) y analizadas mediante cromatografía gaseosa (CG). Cromatógrafo Shimadzu GC – 14 con un integrador Shimadzu CR 4 A o similar. Columna DB –Wax (0.53 mm diámetro interno, 30 m de longitud, 1.5 μ). Inyector y detector (FID) a 250°C. Temperatura inicial: 120°C, 1 min. Gradiente 15°C/ min; temperatura final 200°C, gas carrier N₂ (12 cm³/ min).

La identificación de los compuestos se realiza mediante la determinación y comparación de los tiempos de retención de los constituyentes de la muestra con respecto a drogas Standard (propilenglicol (PEG), dietilenglicol (DEG) y etilenglicol (EG)).

Ensayo en sangre y vísceras.

Para este tipo de muestras pueden llevarse a cabo distintos procedimientos para lograr su aislamiento.

- 1) Homogenatos de tejido o sangre son tratados con ácido perclórico 1.2 M. El sobrenadante obtenido luego de su posterior centrifugación es neutralizado con carbonato de sodio.
- 2) Homogenatos de tejido son tratados con agua destilada, centrifugados y posteriormente sometidos a extracción con metanol. Seguidamente, se evaporan y resuspenden con metanol.

- 3) Homogenatos de tejido son tratados con sulfato de sodio anhidro durante 24 hs. a 40°C. Muestras de hígado y riñón (\cong 10 g) procesadas individualmente en estado de polvo son colocadas en cartuchos de extracción a fin de efectuar una extracción tipo Soxhlet con metanol durante 12 hs. Una alícuota se concentra a baja temperatura en un evaporador a presión reducida. Otra alícuota se almacena a 4 °C. La sangre tratada con metanol (1:10) es homogeneizada y centrifugada. El sobrenadante claro es acondicionado agregándole EG y posteriormente empleado como standard interno.

Condiciones operativas para extractos de vísceras.

Cromatógrafo gaseoso, seleccionado una temperatura inicial de 110°C durante 2 minutos; gradiente de 8°C/ min hacia una temperatura final de 210°C.

Bibliografía.

Guide to Occupational Exposures Values-1996 ACGHI Cincinnati , OH. 1996.

Carboxihemoglobin and Carboxihemoglobinemia en Hemoglobine: molecular, genetic and clinical aspects. Bunn, H. F. And Forget B. G., W. B. Saunders, Philadelphia. pp 663-675. 1986.

Gases In Toxicology, Eyer P. Ed. Marquardt , Schäfer, McClellan and Welsch. Academic Press. 1999.

Isolation and identification of Drugs. Clarke´s Moffat. Edit. Acadmic Press (1986).

Intoxicación oxicarbonada. Estudio bioquímico y metodología analítica. Guatelli, Manuel, EUDEBA .1971.

Guía de Trabajos Prácticos de Toxicología y Química Legal Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Analytical Methods in toxicology. Stahr H. M. John Wiley & Sonas, Inc .1991.

Detection of small amounts of cyanide. Bark, L. S. and Higson H. G. Analyst 88: 751. 1963.

Detection of cyanide in forensic samples. Gettler, A. O and Golbaum L. Anal. Chem. 19:270. 1947.

Acido cianhidrico y cianuros alcalinos. Analítica Toxicológica. Guatelli M. Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Guía de Trabajos Prácticos de Toxicología y Química Legal Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Toxicology, the basic science of poisons. Casarett and Doull´s. Klaassen (eds.), Pergamon Press, Sixth edition, cap 24 y 31. 2001.

Clinical Toxicology. Rumack K. L. and Levejoy, F. H. In M.O. Amdur, J. Doull and C.D.

Analytical methods in toxicology. Sthar H. M. 1990.

Medicina Legal y Toxicología. Gisbert Calabuig, J.A. 4ta. Edición. Ediciones Científicas y Técnicas S.A – Masson- Salvat, Barcelona (España). 1991.

In “Microdiffusion Analysis as Applied to Toxicology”, Milton Feldstein. pp. 641
Steward –Stolman. Toxicology Vol.II

Bioactivation of Cyanide to Cyanate in Sulfur Amino Deficiency: Relevance to Neurological Disease in Humans Subsisting on Cassava. Tor-Agbyde John et al, Toxicological Sciences 50, 228-235 (1999).

Cyanide and Thiocyanate Levels in Blood and Saliva of Healthy Adult Volunteers, Kouichiro Tsuge, Mieko Kataoka, and Yasuo Seto, *Journal of Health Science*, 46(5) 343–350 (2000).

Rapid Determination of Cyanides in Biological Material by HS-GC/MS, *Analysemethoden aus dem Arbeitskreis Klinische Toxikologie*, G. Asselborn and R. Wennig.

HYDROGEN CYANIDE: METHOD 6010, Issue 2, NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), Fourth Edition, 8/15/94.

Hydrogen cyanide and carbon monoxide in blood of convicted dead in a polyurethane combustion: a proposition for the data analysis, Ferrari L., Arado M., Giannuzzi L., Mastrantonio G. y Guatelli M. *Forensic Science International* 121, 140-143, 2001.

Methodologic considerations in the interpretation of postmortem carboxyhemoglobin concentration, Levine B., D’Nicuola J., Kunsman G., Smith M., Stahl. *Toxicology* 115, 129-134, 1996.

Public Health Goal for CYANIDE in Drinking Water, prepared by Pesticide and Environmental Toxicology Section Office of Environmental Health Hazard Assessment
California Environmental Protection Agency, December 1997.

Semi-Quantitative “Spot-test” of Cyanide. Favero J., Tubino M., *Analytical Sciences* vol. 19, August 2003.

TOXICOLOGICAL PROFILE FOR CYANIDE, prepared by: Research Triangle Institute
Under Contract No. 205-93-0606 Prepared for: U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, September 1998.

Cátedra de Toxicología y Química Legal (Fac. de Farmacia y Bioquímica (UBA)

Blood and tissue distribution of methanol and formic acid in victims of a massive intoxication due to the ingestion of adulterate wine. Ferrari, L.A.; Nieto, R.R; Arado, M.G. y Wamba, Z. *Proceedings TIAFT Meetings Padua (Italia)*. 1997

Gas Chromatographic Head –space assay of formic acid and methyl formate in biologic fluids: Potential application to methanol poisoning. Abolin, C.; Mc Rae, J.A.; Tozer T.M., Takki, S *Biochem. Med.* 23, 209 - 218 1980.

Formica acid distribution in accute metanol intoxication. Ferrari L. A., Arado M. G., Nardo C. y Giannuzzi L. *Forens. Sci. Internat.* 133 (3) 152-158. 2003

Ferrari, Arado, Nardo y Giannuzzi (2003) *Forens. Sci. Internat.* 133 (3) 152-158.