



Facultad de Farmacia y Bioquímica
Cátedra de Química legal y Toxicología

TRABAJO PRÁCTICO Nº 1

Año 2021

TÓXICOS GASEOSOS



OBJETIVOS A ALCANZAR

- ✚ Al finalizar el Trabajo práctico que el alumno pueda implementar una marcha toxicológica en un laboratorio de mediana a alta complejidad.
- ✚ El alumno pueda relacionar los marcadores biológicos clínicos que se presentan en el laboratorio de urgencias, con las intoxicaciones por Monóxido de Carbono.
- ✚ El alumno conocerá el funcionamiento de los instrumentales más utilizados para la determinación de COHb en las guardias de Hospitales Públicos y Privados de la provincia.
- ✚ El alumno pueda realizar búsquedas bibliográficas o en medios electrónicos relacionados con la intoxicación por Monóxido de Carbono.

FUENTES DE INTOXICACIÓN

El monóxido de Carbono se genera por combustión incompleta de compuestos que contienen carbono en su estructura química, sean: sólidos (madera), Líquidos (Nafta en automóviles/ Generadores eléctricos) y Gaseoso a partir del metano, butano o propano a través de las hornallas de cocinas, hornos, estufas o calefones.





Facultad de Farmacia y Bioquímica
Cátedra de Química legal y Toxicología

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS CLÍNICOS ALTERADOS EN LAS INTOXICACIONES POR MONÓXIDO DE CARBONO (estar muy atentos en las guardias, sobre todo época invernal)

✚ **Gasometría arterial** (EAB): PO₂ (disminuida en casos graves), pH disminuido, alteración del nivel de Bicarbonato en sangre por insuficiencia renal.

✚ **Acidosis Láctica**: secundario al metabolismo anaeróbico que se produce

✚ **Bioquímica Sanguínea**

Enzimas Cardíacas: CPK: aumentado

MB: Aumentado

Troponina

Estas determinaciones están alteradas por la afectación de oxígeno a nivel Cardíaco

Hepatograma: GOT: aumentada

GPT: Aumentada

Función Renal: Creatinina: aumentada

Urea: aumentada

Esto se debe a la mioglobinuria que impide la filtración glomerular, llevando a desarrollar una Insuficiencia renal

✚ **Análisis de orina**: Mioglobinuria (esto se debe a la rabdomiolisis que se produce. Las tiras reactivas indican hemoglobina positiva, pero en el sedimento no se observan glóbulos rojos)

En los casos graves también se puede observar: hipocalcemia, hipercalcemia, hiperglucemia

✚ **Hemograma**: Evaluar la serie roja debido a que personas que tengan anemia de base (anemia de células falciformes, talasemia o Hb fetal pueden presentar cuadros mas graves en los casos de intoxicación aguda). En la serie Blanca, se observa una leve Leucocitosis con predominio a neutrofilia.

Imágenes de órganos de cadáveres con intoxicación fatal por CO.

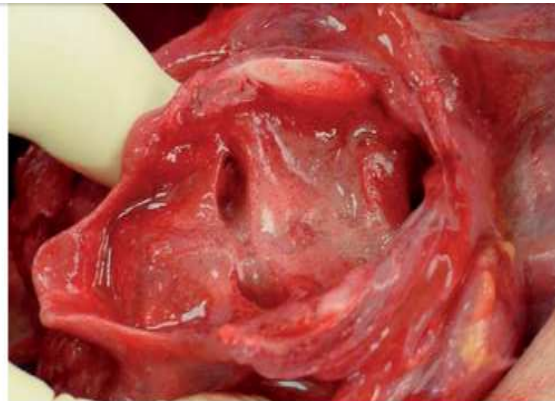


Figura 2.- Edema en laringe.



Figura 3.- Congestión cerebral.



Figura 4.- Corte del encéfalo.



Imagen de cadáver con intoxicación fatal por CO.

MARCHA DE INVESTIGACIÓN TOXICOLÓGICA

Materiales: Sangre entera (anticoagulante EDTA)

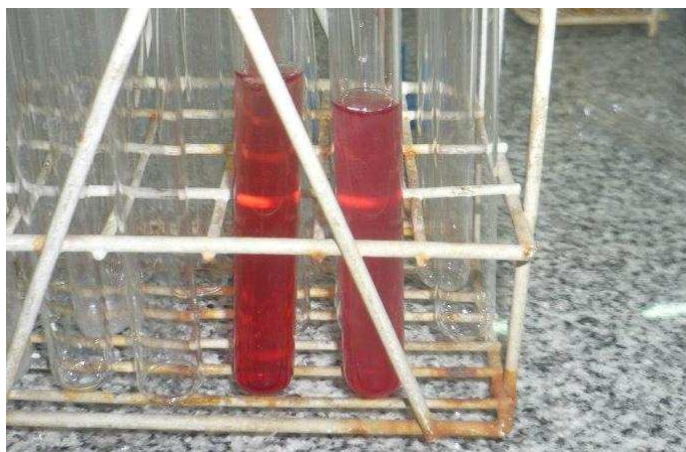
Pool de Vísceras (preferentemente los más vascularizados como: Músculo esquelético, Músculo cardíaco, Hígado)



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

A) REACCIONES DE ORIENTACIÓN

1. ENSAYO DE DILUCIÓN

Se diluye en dos tubos rotulados, una muestra de sangre normal como testigo y la muestra problema al 1% en agua destilada (ver en el práctico, en las sangres de cadáveres varía mucho el hematocrito)



-  sangre normal tiene un color rojo amarillento
-  sangre con monóxido tiene un color rosa carmín (característico)

2. ENSAYO ALCALINO:

Reacción de Hoppe – Seyler: Se les agrega unas gotas de **Na (OH) 20%** a cada tubo y se observa la diferencia y la velocidad de cambio de coloración.



La sangre de un paciente intoxicado cambia de color (verde- Fe^{+3}) después de unos segundos, en forma lenta con respecto a lo que lo hace la sangre normal.

Esto se produce debido a que la sangre con Carboxihemoglobina es más resistente y más estable al tratamiento por álcalis (debido a la unión CO-Hb que es 240 veces mas fuerte que con la OXI-Hb); luego de unos minutos también cambia por lo que es importante la observación inmediata.

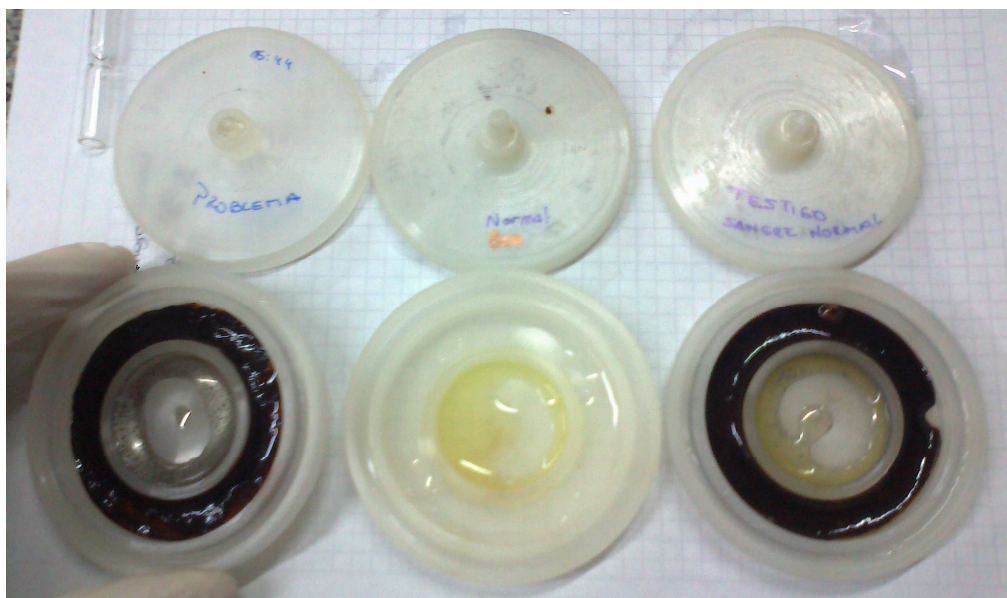
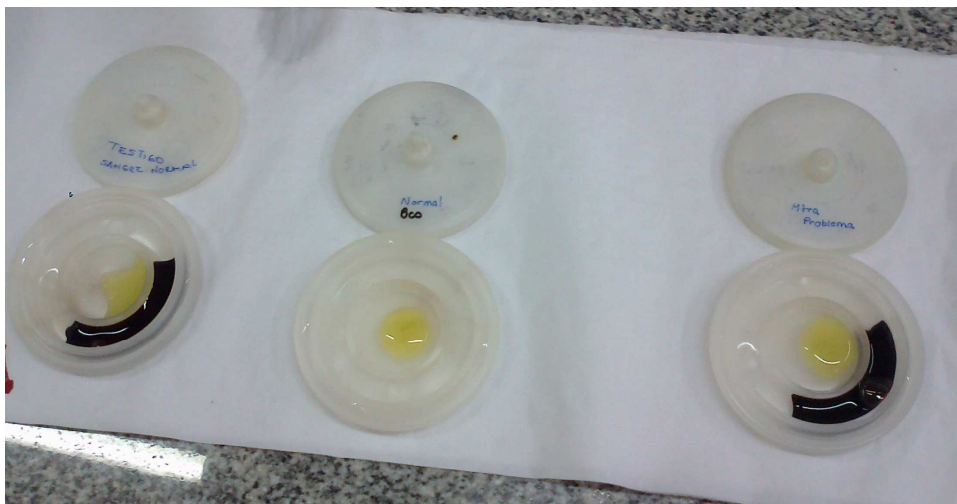
a. REACCION DE CERTEZA

1. Difusión en cámara de CONWAY con cloruro de paladio (Cl_2Pd)

El CO es liberado de su combinación con la hemoglobina por ácidos diluidos (Agente Liberador en cámara externa con la muestra problema: SO_4H_2 al 10% o en caso de sangres putrefactas solución Buffer de Acido Acetico. Acetato de Plomo) y difunde a una Solución Captadora de Cloruro de Paladio (Cl_2Pd 0.1gr%ml de agua) que se coloca en la cámara interna. Se deja entre 1 hora.

Reactivo de Cloruro de Paladio: se debe centrifugar antes de usarlo porque se auto reduce, guardar en frasco oscuro en freezer.

Se debe hacer SIEMPRE aunque sea cualitativa: un BLANCO de reactivos y un TESTIGO con sangre negativa y uno con sangre positiva.



B. CUANTIFICACIÓN

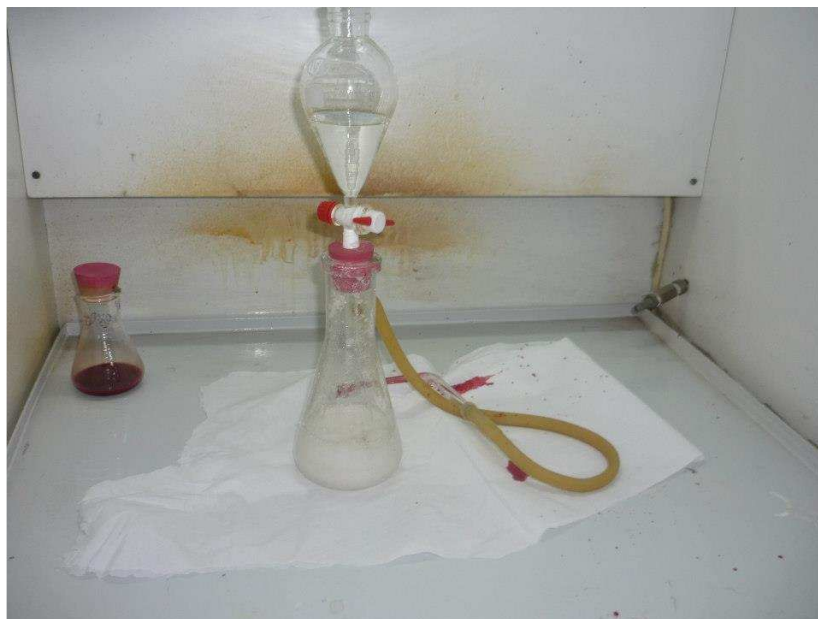
Para cualquier METODO CUANTITATIVO se debe realizar una curva de calibración con: sangre oxigenada con oxígeno gaseoso al 100% y sangre saturada con CO al 100% con un GENERADOR DE CO

GENERADOR DE MONOXIDO:

- Aplicable para todas las técnicas cuantitativas
- El ácido sulfúrico debe agregarse de golpe
- Hacerlo bajo campana con extractor prendido y puertas lo más cerradas posible

Se le saca sangre a una persona NO fumadora y que viva en zona NO céntrica.

Se divide en dos, una alícuota se coloca en el generador de monóxido y la otra se deja como referente de 100% de oxígeno; si se cuenta con tubo de oxígeno se hace burbujear el mismo en la fracción reservada para el 100% del mismo.



a. Método ESPECTROFOTOMÉTRICO de HEILMAYER

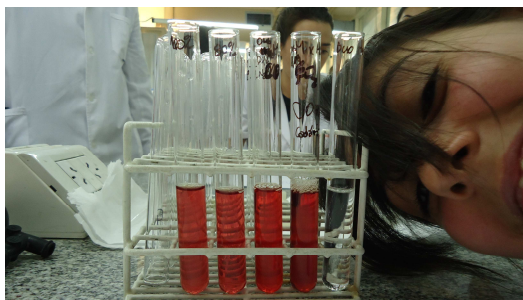
CURVA en papel milimetrado

- 1- Realizar Curva con diluciones de sangre al 100% de CO diluida y con sangre Normal diluida (las dos diluciones deben ser exactamente en igual proporción), por ejemplo: 1 mililitro en 200ml de agua destilada de cada fracción
- 2- Se procede a realizar la curva con las siguientes diluciones

	1	2	3	4	5
Sg carboxi 100% dil	-----	2ml	5ml	8ml	10ml
Sg oxigenada diluida	10ml	8	5	2	-----
Amoniaco	1gtt	1gtt	1gtt	1gtt	1gtt
CARBOXIHb %		20%	50%	80%	100%
OxIHb %	100%				

- 3- Realizar las lecturas de las absorbancias correspondientes a las longitudes de onda de 576 y 560, llevar a tabla el cociente en abscisas y el % de COHb en ordenadas

	576	560	coeficiente
100% OxIHb			
20% CARBOXIHb			
50% CARBOXIHb			
80% CARBOXIHb			
100% CARBOXIHb			



- 4- Pasar los valores a papel milimetrado

ESQUEMA DE TRABAJO CON BLANCO Y PROBLEMAS

	BLANCO	PROBLEMA (muerto)	PROBLEMA (s. normal)
AGUA	10ml	10ml	10ml
AMONÍACO	50μl	50μl	50μl
Sangre Problema	-	50 a 100μl	50 a 100μl
576			
560			
576/560			
% de CO			

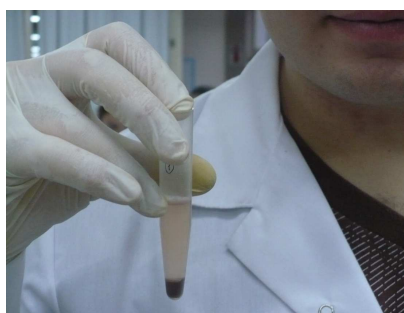


Facultad de Farmacia y Bioquímica
Cátedra de Química legal y Toxicología

b. Técnica de WOLFF

FUNDAMENTO

- 1- En sangre con monóxido de carbono en las siguientes condiciones: diluida con agua, luego en medio de buffer acético/acetato de sodio a 55°C, cinco minutos exactos, precipitan todas las hemoglobinas excepto la CO - Hb. (colocar 10ml de sangre fresca y saturar con CO esta sangre utilizar como 100%)**



- 2- Se hacen lecturas a 538nm y a 570nm de la muestra problema y de un testigo llevado al 100% de CO (preferentemente de la misma muestra problema); se hace la relación entre ellas según la fórmula para sacar el % de CO de la muestra problema.**

REACTIVOS

Preparación del Buffer acetato Ph 5

- 1- Ácido acético 300 gr. y H₂O destilada c.s.p. 1000mL**
- 2- Acetato de sodio trihidratado 408 gr. y H₂O destilada para 1000ml**

Solución de trabajo: **1 parte de 1, más 3 partes de 2**

TECNICA:

- 1- Preparación de diluciones**

	Problema 1	CO al 100% de la sangre normal
Sangre	0,5ml	0,5ml
H₂O	2ml	2ml

- 2- Luego de tener las diluciones preparadas, tomo 1ml de cada una y le coloco 4ml del Buffer recién preparado.**

- 3- Cada uno de los tubos (perfectamente rotulados) se llevan **"EXACTAMENTE"** a
 - **55°C**
 - **durante 5 minutos cronometrados.**
 - En estas condiciones precipitan todas las hemoglobinas excepto la CO-HB
- 4- Se sacan del BM los tubos y se filtran o bien se sacan del BM y **se los centrifuga a 5 minutos y 5000 rpm.**
- 5- El filtrado se lee a 538nm y a 570nm. Se lleva a 0 con H₂O

CÁLCULO

$$\frac{(\text{Lectura Problema a 538nm}) - (\text{Lectura Problema a 570nm})}{(\text{Lectura 100\% CO a 538nm}) - (\text{Lectura 100\% CO a 570nm})} \times 100$$

% muestra muerto = _____ = %

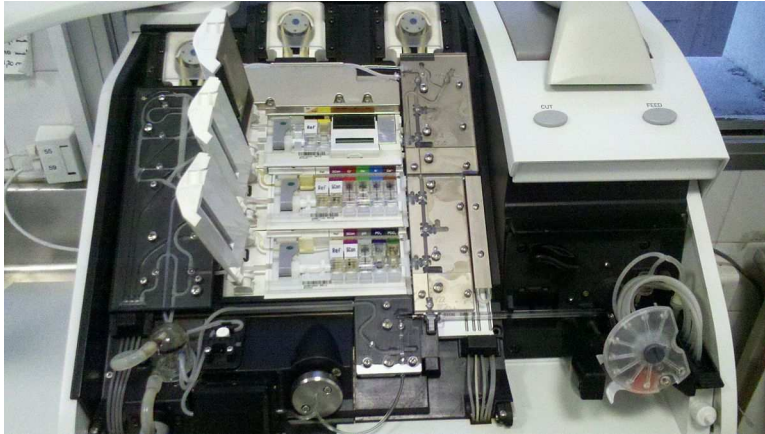
DETERMINACION DE MONOXIDO DE CARBONO POR CO-OXIMETRIA

✚ **Determinación de CO por cooximetría.** Muchos autoanalizadores de última generación, poseen módulos denominados COOX (cooximetría), el mismo permite el estudio de de Carboxihemoglobina, Metahemoglobina, determinación de Bilis total.

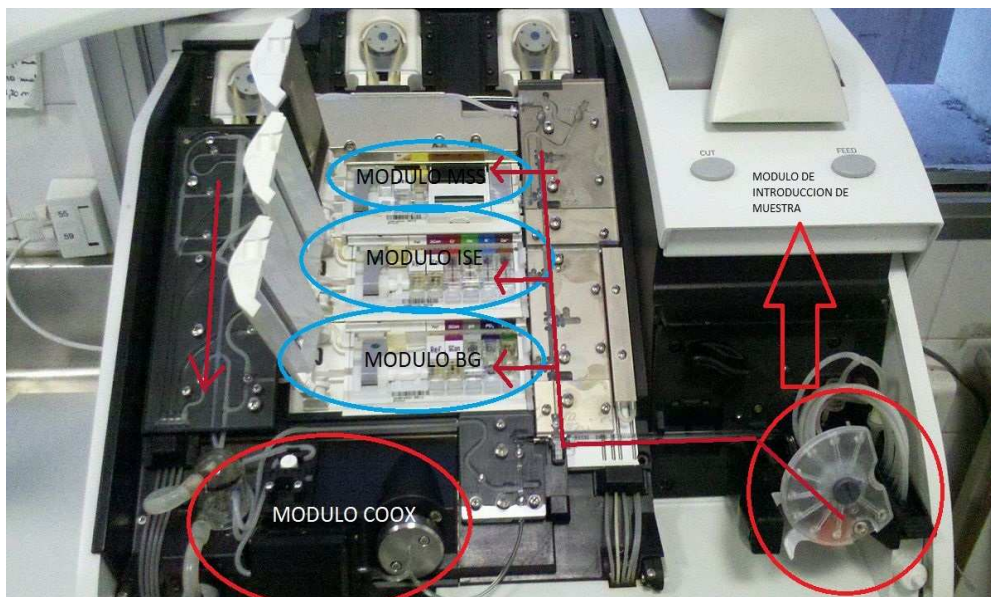
A continuación, mostramos una imagen del módulo COOX, y su funcionamiento.



Imagen cobas b221



Módulo COOX



Se observa el instrumental abierto, y sus diferentes módulos expuestos. Se puede observar el circuito que sigue la muestra, el mismo se detalla en un color Rojo con flechas ingresando por el módulo de introducción, pasando por capilares internos en la parte derecha del instrumental (visto de frente), y luego saliendo por el otro lado el material de desecho posterior a las mediciones.

Como todo instrumental que utiliza muestras biológicas, requiere ser manipulado siguiendo las normas de bioseguridad correspondientes.

Métodos de medición.

PO2: Principio de medición según Clark, es decir, medición de una corriente originada por la reducción de oxígeno en un electrodo de platino.

PCO2: Principio de Severinghouse, es decir, medición potenciométrica de la variación del pH en interior del electrodo, causada por el ingreso de la CO₂ de la muestra.

Electrodos pH, Na, K, Cl, Ca iónico:

Son electrodos potenciométricos, en el caso del pH y el Na se utilizan vidrios especiales como elemento sensitivo.

Las membranas de K y Ca iónico contienen portadores neutros especiales y con el Cl se aplica un intercambiador iónico especial. La determinación de estas magnitudes de medida requiere asimismo el uso de un electrodo de referencia que en el cobas b221 se trata de un electrodo de Cloruro de contacto Fijo.

Glucosa/Lactato: bajo acción del oxígeno atmosférico, la glucosa es oxidada en presencia de la enzima Glucosa Oxidasa (GOD) formando gluconolactona, y de igual forma el lactato, con la enzima lactato oxidasa, formando piruvato.

El H₂O₂ resultante se determina por método amperométrico utilizando un electrodo de pirolusita/carbón a 350mV

Módulo COOX: El módulo COOX se compone del Hemolizador y la cámara de medición COOX. La medición se basa en el principio de fotometría espectral (Ley de Lambert-Beer)

Método Espectrofotométrico

Muestra: sangre venosa (presenta buena correlación con la sangre arterial)

FOTOMETROS PARA MÚLTIPLES LONGITUDES DE ONDA. LECTURA DE LA ABSORBANCIA A 4 O 5 LONGITUDES DE ONDA PARA UNA MUESTRA DE SANGRE ENTERA
 - MEDIANTE ALGORITMOS PROGRAMADOS CALCULAN LA PROPORCIÓN DE CADA COMPONENTE DE LA HEMOGLOBINA TOTAL EN UN MICROPROCESADOR
 - HAY EQUIPOS EN LOS CUALES SE INYECTAN MUESTRAS DIRECTAMENTE DE CAPILARES HEPARINIZADOS.

PUEDEN INTERFERIR EN LA DETERMINACIÓN ELEVADOS NIVELES DE BILIRRUBINA Y MUESTRAS LIPÉMICAS.

SENSIBILIDAD: 0,2 %



Facultad de Farmacia y Bioquímica
Cátedra de Química legal y Toxicología

Los niveles normales de Carboxihemoglobina sanguínea no superan el 1-2%. Se considera el diagnóstico de intoxicación a partir del 5%.

Es importante saber que la hemoglobina fetal interfiere con la medición de COHB en algunos cooxímetros proporcionando valores falsamente elevados. Esto es de interés, sobre todo, en lactantes menores de 3 meses y en aquellas anemias con elevación de los niveles de hemoglobina fetal.

En general, se puede decir que los primeros síntomas suelen aparecer con niveles superiores al 5-10%; niveles por encima del 50-70% pueden Producir la muerte.

En el CMF se han encontrados casos de muertes con valores entre 20-30% Carboxihemoglobina en mayores adultos (por tener algunas alteraciones cardíacas o pulmonares) y en los individuos encontrados quemados de incendios.

VALORES DE CO-Hb

No fumadores: 0- 2,3 %

Fumadores: 2,1 – 6,0 %

Fumadores pasivos: 3-4%

Áreas urbanas contaminadas: hasta el 2,5%

Áreas urbanas muy contaminadas: hasta el 7-8%

CORRELACION ENTRE LOS NIVELES DE CO-HB Y SINTOMATOLOGIA CLINICA

Esta correlación fue elaborada en base a síntomas clínico manifestados por los pacientes intoxicados lo que lleva a ser de tipo experimental.

El grado de intoxicación por monóxido de carbono (% CO-Hb) y su correlación con la clínica, depende de distintos factores:

1. **Factores independientes del Individuo:** Tiempo de exposición frente al Tóxico, la concentración del Tóxico en el ambiente, de la sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión del método utilizado para determinación del porcentaje de carboxi-Hb
2. **Factores dependientes del individuo:** Estado general del paciente (cardiaco-pulmonar, si presenta alguna disfunción de la serie roja ejemplo: anemia), Edad del paciente (fetos, recién nacidos, adultos mayores), Estado metabólico (individuo en movimiento o estado de reposo)

< 10 % Asintomático

10-20 % Asintomático o cefalea

20-30 % Mareo, vértigo, náuseas, Vómitos, disnea

30-40 % Alteraciones visuales

40-50 % Confusión, desorientación, síncope

> 50 % Coma, disfunción cardiopulmonar, muerte

TRABAJO PRÁCTICO DE AULA

- 1) buscar un caso clínico relacionado con monóxido de Carbono

BIBLIOGRAFIA

- ✚ Prácticos de años anteriores, confeccionados por la Dra. Raquel Fernández. Bioquímica – Toxicóloga-Licenciada en Criminología y fotos, algunas de ellas, fueron aportadas por alumnas de años anteriores.
- ✚ Curso de **FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGÍA CLÍNICA Y ANALÍTICA**. Dictado por Asociación Bioquímica Argentina año 2018 tema: Gases no irritantes: Monóxido de Carbono y Cianuro. Intoxicación por Humo de Incendios. *Dra Adriana Ridolfi. Profesora Titular. Cátedra de Toxicología y Química Legal-FFyB-UBA. E-mail: aridolfi@ffyb.uba.ar*
- ✚ Dueñas-Laita et col. Bases para el manejo clínico de la intoxicación por humo de incendios.
- ✚ Documento de Consenso. Emergencias 2010; 22: 384-394
- ✚ Gisbert Calabuig, J. A. & Villanueva Cañadas, E. - Medicina legal y toxicología (6ed, Masson)
- ✚ **MANUAL DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS TOXICOLÓGICOS PARA LABORATORIOS DE BAJA COMPLEJIDAD** Basado en: Basic Analytical Toxicology R.J. Flanagan; R.A. Braithwaite; S.S. Brown; B. Widdop and F.A. de Wolff UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME INTERNATIONAL LABOUR ORGANISATION WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY Geneva, 1995 TRADUCCIÓN Y ADAPTACIÓN Realizada por: Gabriela Fiorenza Biancucci, Diana González, Adriana Pérez, Adriana Ridolfi, Analía Strobl. ARGENTINA, 200