



Guía de Trabajos Prácticos:

TOXICOLOGÍA Y QUÍMICA LEGAL

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia-UNSL



MATERIAL DIDÁCTICO
PARA ESTUDIANTES
2025

SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

Guía de Trabajos Prácticos:

TOXICOLOGÍA Y QUÍMICA LEGAL

Licenciatura en Bioquímica

Autores:

Paul Emir HASUOKA

Pablo Hugo PACHECO

Nelson Hugo FERRÚA

María Cecilia PACHECO



FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2025

RESPONSABLES DE LA PUBLICACIÓN

Decano

Dra. Sebastián ANDUJAR

Secretario Académico

Dr. Oscar PARRAVICINI

*Comisión de la Serie Didáctica:
Material Didáctico para Estudiantes*

Coordinadora

Dra. Yamina DÁVILA

Integrantes

Departamento de Biología

Mg. Karina Ethel MARCHEVSKY

Dra. María Beatriz NÚÑEZ

Departamento de Bioquímica

Dra. Verónica FILIPPA

Dra. Ethelina CARNELUTTI

Departamento de Farmacia

Dra. Cecilia PERALTA

Dra. Ana VICARIO

Departamento de Química

Dr. José A. BOMBASARO

Dra. Cinthya A. MAGALLANES NOGUERA

Edición

Secretaría de Investigación, Vinculación y Extensión

SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N°269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudio dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acordes al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL (<http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mde.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

Nota de los Autores

Paul Emir Hasuoka: Jefe de Trabajos Prácticos, suplente, dedicación exclusiva. Licenciado en Bioquímica (UNSL). Doctor en Bioquímica (UNSL).

Pablo Hugo Pacheco: Profesor Adjunto, Efectivo, dedicación exclusiva; Investigador Adjunto (CONICET); Bioquímico (UNSL); Doctor en Bioquímica (UNSL).

Nelson Hugo Ferrúa: Profesor Asociado, Efectivo, dedicación exclusiva. Licenciado en Bioquímica (UNSL); Doctor en Bioquímica (UNSL).

Índice de Contenidos

Normas Generales de Seguridad en el Laboratorio de Toxicología y Química Legal.....	III
Trabajo Práctico N.º 1: Etanol.....	1
Trabajo Práctico N.º 2: Monóxido de Carbono.....	10
Trabajo Práctico N.º 3: Metanol.....	17
Trabajo Práctico N.º 4: Cianuros.....	23
Trabajo Práctico N.º 5: Salicilatos.....	30
Trabajo Práctico N.º 6: Paracetamol.....	34
Trabajo Práctico N.º 7: Arsénico.....	39
Trabajo Práctico N.º 8: Mineralización de Sangre y Análisis Por Espectrometría de Masas Con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP MS)	46
Trabajo Práctico N.º 9: Talio.....	50
Trabajo Práctico N.º 10: Mercurio.....	59
Trabajo Práctico N.º 11: Coproporfirinas.....	64
Trabajo Práctico N.º 12: Barbitúricos.....	72
Trabajo Práctico N.º 13: Marihuana.....	77
Trabajo Práctico N.º 14: Alcaloides.....	82
Trabajo Práctico N.º 15: Determinación de Cocaína Por Cromatografía Líquida De Alta Resolución (HPLC)	88
Trabajo Práctico N.º 16: Anfetamina.....	96
Trabajo Práctico N.º 17: Pesticidas Fosforados.....	100
Trabajo Práctico N.º 18: Manchas De Sangre.....	106
Trabajo Práctico N.º 19: Manchas De Esperma.....	114
Trabajo Práctico N.º 20: Tintas.....	120
Trabajo Práctico N.º 21: Pelos.....	128

* Referencia para los trabajos prácticos. En el texto de la Guía se han realizado ligeras modificaciones en las técnicas originales respecto de las ACTIVIDADES A DESARROLLAR, que no modifican los resultados obtenidos en las mismas. En aquellos pasos donde se han realizado modificaciones, entre paréntesis y letra gris, está aclarado lo establecido por la ACTIVIDADES A DESARROLLAR acorde a la técnica original.

Normas Generales de Seguridad en el Laboratorio de Toxicología y Química Legal

Generalidades

- ✓ Las Normas de Seguridad son elaboradas para evitar accidentes a través de la ejecución correcta del trabajo. Por eso deben ser integralmente respetadas.
- ✓ Siga todas las indicaciones de Seguridad transmitidas por el personal que conduce las tareas, divúlguelas en su ambiente de trabajo y comunique inmediatamente cualquier situación que ofrezca riesgo de accidente.
- ✓ Sea previsor cuidando no sólo de usted, sino también de la seguridad de sus pares.
- ✓ La cortesía, el respeto y la colaboración con sus compañeros de trabajo contribuye mucho para un buen desempeño de la tarea y para la prevención de accidentes.
- ✓ Los avisos y las señalizaciones de seguridad existen para su protección e información: "Respételas Siempre".
- ✓ Las bromas durante el trabajo, así como las actitudes que desvían la atención de quien ejecuta una tarea, son causa de muchos accidentes, por eso deben ser evitadas.

Normas de Conducta Personal en el Laboratorio

El alumno deberá conocer detalladamente antes de ingresar al laboratorio, la explicación y la ACTIVIDADES A DESARROLLAR del Trabajo Práctico que realizará.

Cuando se va a realizar una experiencia en el laboratorio es *obligatorio el uso de guardapolvo de algodón*. Además, cuando se trabaja con sustancias químicas de cierta peligrosidad o con muestras biológicas se debe usar también: *Guantes de látex, gafas de seguridad y barbijo*.

En el laboratorio está *prohibido comer, beber, fumar, morder los lápices, llevarse las manos o los materiales en uso a la boca o a los ojos*.

Mientras está en el laboratorio lavarse periódicamente las manos. Tenga siempre una toalla de manos solo para ese fin o distinta de los repasadores para uso de laboratorio, un repasador y un encendedor.

No probar, con el olfato o gusto, jamás un compuesto químico o de propiedades desconocidas.

No se debe oler directamente ningún producto químico o al menos que el responsable del Laboratorio, o la ACTIVIDADES A DESARROLLAR que está realizando, lo indique expresamente.

No pipetear nunca con la boca, al menos que se lo especifique. Se debe utilizar propipetas.

Informar de cualquier accidente por más pequeño que sea al responsable del Laboratorio.

Para el uso de distintos instrumentales se deberá tener conocimiento y acceso a los manuales de Procedimiento.

En el laboratorio se debe trabajar con concentración, en forma cuidadosa y con conocimiento del tipo de sustancia que se utilizan. Tener apagados los celulares o no utilizarlos durante las experiencias.

Tener a mano su cuaderno de laboratorio, lápiz, lapicera, calculadora y lápiz marca vidrio.

Sobre la mesada se colocarán sólo los materiales y reactivos que se utilizarán en el práctico.

Al finalizar la experiencia dejar todo el material ordenado y limpio; la mesada limpia, seca y ordenada tal como la recibió.

Normas de Procedimiento General en el Laboratorio

Al utilizar material de vidrio es necesario comprobar su perfecto estado. Descartar aquel material rajado, golpeado o roto. Recoger el material roto y entregarlo al responsable del laboratorio.

Quando se calienta un material de vidrio, diferenciarlo perfectamente del resto, dado que **"el vidrio caliente tiene el mismo aspecto que el vidrio frío" y puede producir accidentes.**

Si se utiliza material que contienen robinetes o mariposas, hay que verificar su estado: posibilidad de giro y buen ajuste.

Se deben seguir las normas de calentamiento cuando se utiliza fuego directo de muestras en tubos de ensayo, vasos, etc. para evitar proyecciones sobre uno mismo u otra persona.

Es conveniente trasvasar, siempre que sea posible, cantidades pequeñas de líquidos cuando estos son peligrosos. Al trasvasar se deberá realizar en una zona específica para ello.

Efectuar los trasvases de sustancias lejos de los focos de calor.

Los productos inflamables (gases, alcohol, éter, etc.) no deben manipularse, ni estar cerca de fuentes de calor.

Si se debe calentar recipientes con estos productos se hará a baño maría.

Si se trabaja con sustancias que emiten vapores tóxicos es preciso contar con buena ventilación o hacerlo bajo campana con extractor encendido.

Comprobar cuidadosamente los rótulos de los envases de reactivos antes de utilizar a los mismos. Mantener las etiquetas de los envases en buen estado.

Es importante el orden y disposición de materiales y reactivos en la mesa de trabajo, así como la rotulación del material de vidrio a utilizar o muestras a examinar.

No dejar envases abiertos.

Identificar perfectamente los productos cuando se los trasvasan a otros recipientes.

No sustituir en las experiencias un producto por otro sin consentimiento del responsable.

Se debe tirar los residuos sólidos y papeles en el recipiente adecuado. *No arrojarlos en la pileta.*

No verter nunca agua sobre ácidos concentrados. Verter siempre el ácido en pequeñas cantidades, sobre el agua agitando constantemente y asegurar la refrigeración exterior.

Siempre que sea posible se deben utilizar reactivos de grado analítico que cumplan con normas internacionales de calidad (ACS, ISO).

Todos los reactivos deben ser almacenados en recipientes adecuados, con etiquetas que indiquen nombre del reactivo, fecha de preparación, concentración, disolvente de la solución y analista.

Normas Para Desechos de Residuos

Residuos comunes:

Engloba a restos de alimentos, cajas, papel, envases inocuos, etc. Estos serán descartados en los recipientes de "basura común".

Residuos Químicos:

a) Pueden desecharse por la cañería:

Los residuos hidrosolubles (solubilidad en agua no menos de 30 g/L) dejando correr agua en volúmenes superior al del desechado.

No tirar productos no biodegradables.

b) No pueden desecharse por la cañería:

- Sustancias con punto de ebullición menor a 50 °C
- Mezclas o compuestos insolubles que pueden producir bloqueo en las cañerías.
- Sustancias químicas explosivas (ej. Peróxidos).
- Sustancias químicas de alta toxicidad.

El material líquido no debe ser desechado ni en frascos ni en bolsas si no ha sido previamente neutralizado.

c) Guantes y residuos biológicos en bolsa roja.

Informe de Laboratorio

Es indispensable que al iniciar una experiencia disponga de un cuaderno, sobre el que escribirá en detalle las experiencias realizadas. El informe de laboratorio requiere que sea *comprendido* por cualquier persona que lo lea, y por lo tanto debe ser prolijo, claro y con toda la información posible y concisa, entre ellas gráficos, formulación de reacciones, cálculos, tablas, etc. Además de las conclusiones.

En general en un correcto informe se detallan:

1. Título y número del trabajo de laboratorio
2. Fecha
3. Objeto de las experiencias
4. Materiales y métodos
5. Resultados y discusión
6. Conclusiones

Finalizada una jornada de trabajo y antes de retirarse del laboratorio, el alumno deberá presentar el cuaderno de trabajo al Jefe de Trabajos Prácticos, el cuál examinará lo consignado y firmará el cuaderno. Este procedimiento es constancia para los alumnos de la realización de T.P. y de asistencia al mismo.

Normas Generales de Seguridad en un Laboratorio

Las reglas esenciales para la seguridad en un laboratorio químico pueden ser expresadas en dos simples subtítulos: **siempre** y **nunca**.

Siempre:

- ✓ Utilice adecuada protección ocular (anteojos y/o protector facial).
- ✓ Utilice guantes aptos para manipular sustancias químicas.

- ✓ Lave cuidadosamente sus manos con abundante agua y jabón al finalizar sus tareas en el laboratorio.
- ✓ Lea atentamente las instrucciones antes de iniciar cualquier experimento.
- ✓ Mantenga su área de trabajo limpia y ordenada.
- ✓ Esté atento a las salpicaduras y/o derrames de líquidos.

Nunca:

- ✓ Beba o coma en el laboratorio.
- ✓ Fume en el laboratorio.
- ✓ Caliente líquidos inflamables con llama directa.
- ✓ Introduzca material enjuagado con solventes inflamables en la estufa de secado.
- ✓ Pruebe o inhale sustancias químicas salvo que se le indique.
- ✓ Camine innecesariamente por el laboratorio.
- ✓ Distraiga a sus compañeros de trabajo.
- ✓ Corra en el laboratorio, ni aún en caso de accidente.
- ✓ Trabaje solo en el laboratorio.
- ✓ Lleve a cabo experimentos no autorizados.

* Estas Normas de Seguridad pueden ser preguntadas en las exámenes parciales o cuestionarios de la materia.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 1

Etanol

Objetivos

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de la técnica de microdifusión.
- Adquirir destreza en la ejecución de la técnica de microdifusión y en el manejo de tóxicos volátiles, ponderando y evitando posibles fuentes de error.
- Determinar etanol en muestras de interés toxicológico, laboral, forense y legal.
- Interpretar los resultados acordes a marco legal vigente.

Introducción Teórica:

Microdifusión

Es posible separar tóxicos volátiles de una muestra biológica utilizando un método sencillo de separación: la difusión.

Fundamentos de la Difusión

Tenemos 2 recipientes A y B bajo campana de manera que la fase gaseosa sea la misma, y supongamos que en A tenemos una solución de una sustancia volátil cualquiera a la que llamamos X, mientras que en B hay un solvente puro en la que X es soluble. Si dejamos un tiempo en esas condiciones tendremos un pasaje de la sustancia X desde A a B hasta que se logre un equilibrio dinámico entre ambas y X estará entonces en la misma concentración en A y en B. Pero si en B colocamos un solvente donde X sea más soluble que en A, este equilibrio se va a desplazar y se logrará que en B haya más concentración que en A. Pero este equilibrio puede forzarse hasta que toda la sustancia X volátil que estaba en A pase a B lográndose la separación total. Tenemos dos caminos para este objetivo: 1) colocando en B una sustancia que fije a X, un fijador (por ejemplo, transformándolo en otra especie mediante una reacción redox); o 2) agregando en A un agente liberante de X en su solución, por ejemplo, una sustancia donde X sea insoluble.

Este tipo de separación puede llevarse a cabo en escala macro y micro.

Se ha generalizado tanto la escala micro que prácticamente se habla de microdifusión y así nos vamos a referir a ella y es el método que vamos a utilizar.

Ventajas frente a la destilación:

- Método rápido.
- No requiere equipos complicados y costosos.
- Trabaja con pequeñas cantidades de muestra.
- No necesita vigilancia personal permanente.
- Tiene buena sensibilidad.

En la práctica se utilizan celdas de Conway (Figura 1) que pueden ser de diversos materiales: porcelana, vidrio, plástico; etc. y se utilizan según la muestra a analizar. Así las de plástico se utilizan para trabajar con ácido fluorhídrico, ya que éste atacaría al vidrio o a la porcelana vidriada.

Las hay también de distinto tamaño, se elegirán de acuerdo a la cantidad de muestra a analizar. Las de 3,5 cm de diámetro para la cámara interna, y 6 cm de diámetro para cámara externa se utilizan en general para muestras de hasta 1 mL, que son las que se utilizarán en el T. P. También existen celdas de menor tamaño, 1,5 cm de diámetro para la cámara interna, y 4 cm de diámetro para cámara externa, en las que se debe trabajar reduciendo las cantidades de muestras y reactivos exactamente a la mitad. Las de 7 – 8 cm de diámetro interno para muestras de 2 – 3 mL serán muy útiles en caso de muestras muy diluidas donde será necesario tomar más volumen.

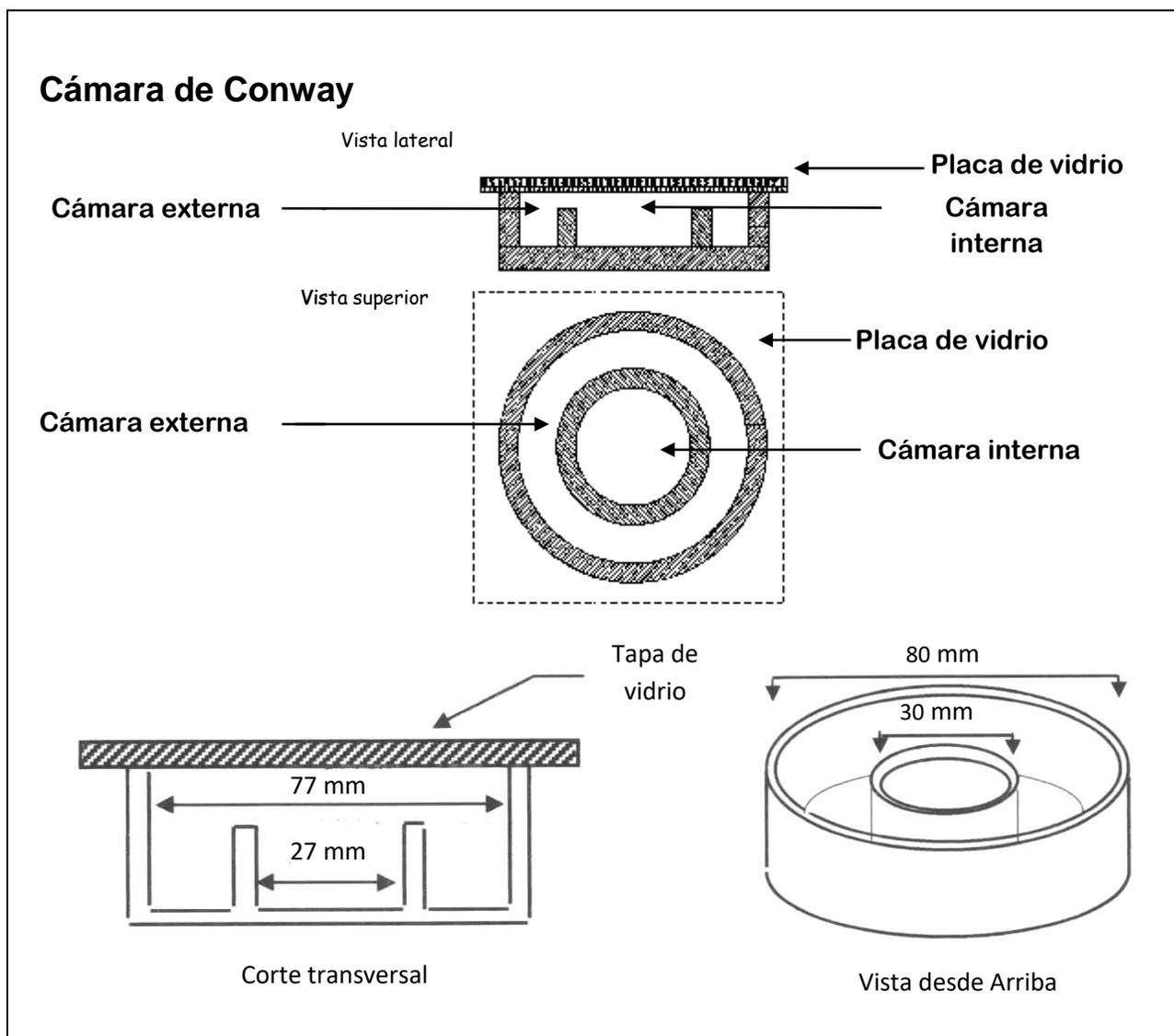


Figura 1. Cámara de Conway para Microdifusión.

El tiempo de difusión dependerá de:

- Temperatura, que tiene gran influencia.
- Volatilidad de la sustancia problema.
- Cantidad de muestra.

- d. Naturaleza del fijador.
- e. Naturaleza del agente liberante.

Para llevar a cabo una microdifusión hay que tener en cuenta el buen cierre de la celda. Debe ser totalmente hermética para que no haya pérdidas de sustancias volátiles. Esto se logra lubricando la tapa de la celda convenientemente. Se usa generalmente vaselina o grasa de siliconas (cuando se requiere temperatura) según la muestra y la temperatura a utilizar en la difusión.

Para cargar la celda se procede de la manera siguiente:

- Lubricar la tapa para tenerla preparada cuando se necesita.
- Colocar el agente fijador en la cámara central.
- Colocar la muestra en un extremo de la cámara externa.
- Colocar agente liberante en el extremo opuesto al que hemos colocado la muestra y tapar rápidamente. Este último paso tiene como variante colocar la tapa dejando espacio para colocar el agente liberante y luego correr la tapa hasta que esté totalmente cerrado.
- Mezclar por rotación luego de tapar y dejar difundir el tiempo necesario.

Utilizamos microdifusión para metanol, etanol y monóxido de carbono, también se puede aplicar a muestras conteniendo cianuros, fenol, formol.

Etanol

Características

El etanol a temperatura y presión ambiente es un líquido incoloro y volátil que está presente en diversas bebidas fermentadas y destiladas. Se obtiene el etanol por fermentación anaeróbica de una disolución con contenido en azúcares (almidón y celulosa) con levadura y posterior destilación. Para obtener etanol libre de agua se aplica la destilación azeotrópica en una mezcla con benceno o ciclohexano.

Usos

Además de usarse con fines culinarios como en diversas bebidas alcohólicas, el etanol se utiliza ampliamente en muchos sectores industriales y en el sector farmacéutico, como excipiente de algunos medicamentos y cosméticos, en el caso del alcohol antiséptico 70° GL (grados Gay-Lussac, equivalentes a 70 % v/v a 20 °C) y en la elaboración de ambientadores y perfumes.

También es un desinfectante. Su mayor potencial bactericida se obtiene a una concentración del 70 %. Se emplea como combustible industrial y doméstico.

Intoxicaciones con Etanol

Mecanismo de Acción

El etanol actúa sobre los receptores GABA de tipo A (GABA_A) como modulador alostérico positivo aumentando el flujo de iones transmembrana lo que induce a un estado de inhibición neuroquímica, efecto ralentizador.

Sintomatología

Alcoholemia en gramos %	Síntomas
0,01 – 0,05	Comportamiento aparentemente normal
0,03 – 0,12	Leve euforia, sociabilidad, disminución de las inhibiciones, aumento de confianza en sí mismo, disminución de la atención, el juicio y el control.
0,9 – 2,50	Inestabilidad emocional, pérdida del juicio crítico, deterioro de la percepción, la memoria y la comprensión, disminución de la respuesta sensorial, mayor tiempo de reacción, reducción de la agudeza visual, y de la visión periférica.
1,80 – 3,00	Desorientación, confusión mental, mareos, estados emocionales exagerados, alteraciones de la visión y de la percepción del color, la forma, el movimiento y las dimensiones, aumento del umbral del dolor, aumento de incoordinación muscular, marcha tambaleante, dificultad para hablar, apatía, y letargo.
2,50 – 4,00	Inercia general, pérdida de las funciones motoras, incoordinación muscular, incapacidad para permanecer de pie o caminar, vómitos, incontinencia, inconsciencia, sueño o estupor.

3,50 – 5,00	Inconsciencia completa, sin reflejos, estado de coma, disminución de la temperatura corporal, incontinencia, deterioro de la circulación y la respiración, posible muerte
> 4,50	Muerte por paro respiratorio

Legislación Nacional

En Argentina, la Asociación Civil Luchemos por la Vida calcula que el consumo de alcohol es el factor determinante en 50 % de las muertes en accidentes de tránsito.

Ley 24.449 Ley de tránsito

Art 48 – Queda prohibido conducir con impedimentos físicos o psíquicos, sin la licencia especial correspondiente, habiendo consumido estupefacientes o medicamentos que disminuyan la aptitud para conducir. Conducir cualquier tipo de vehículos con una alcoholemia superior a 500 miligramos por litro de sangre (0,5 g/l). Para quienes conduzcan motocicletas o ciclomotores queda prohibido hacerlo con una alcoholemia superior a 200 miligramos por litro de sangre (0,2 g/l). Para vehículos destinados al transporte de pasajeros de menores y de carga, queda prohibido cualquiera sea la concentración por litro de sangre. La autoridad competente realizará el respectivo control mediante el método adecuado aprobado a tal fin por el organismo sanitario. (Inciso sustituido por art. 17 de la Ley N° 24.788 B.O. 03/04/1997).

El Senado y Cámara de Diputados de la Nación Argentina reunidos en Congreso, sancionaron el 3 de abril del 2023 la actualización de la Ley 24.449 Ley de tránsito, estableciendo. -

Art 48 - Queda prohibido conducir con impedimentos físicos o psíquicos, sin la licencia especial correspondiente, habiendo consumido estupefacientes o medicamentos que disminuyan la aptitud para conducir. Asimismo, queda prohibido conducir cualquier tipo de vehículos con una alcoholemia superior a cero (0) miligramos por litro de sangre. La autoridad competente realizará el respectivo control mediante el método adecuado aprobado a tal fin por el organismo sanitario. (Inciso sustituido por art. 1° de la Ley N° 27.714 B.O. 3/5/2023).

Legislación Provincial

En San Luis a partir del 19 de septiembre del 2023 se encuentra vigente la Ley de Alcohol Cero, mediante la Ley provincial N° X-1110-2023, que adhiere a la Ley nacional 27.714 sobre “Tolerancia Alcohol Cero”, que establece la prohibición de conducir cualquier tipo de vehículos con una alcoholemia superior a (0) cero miligramos por litro de sangre.

Ley 24.788 - Ley Nacional de Lucha contra el Alcoholismo

Prohíbese en todo el territorio nacional, el expendio a menores de dieciocho años, de todo tipo de bebidas alcohólicas.

Fundamento de la Técnica de Determinación de Etanol

El etanol es liberado de una muestra biológica por el agregado de una solución saturada de carbonato de potasio, luego difunde a la cámara central y allí es oxidado por una solución sulfúrica de dicromato de potasio. Trabajando con un blanco de solución sulfúrica de dicromato de potasio y un testigo de etanol de concentración conocida, puede determinarse cuantitativamente la concentración de etanol en la muestra, por espectrofotometría.



Materiales y Métodos

Muestra: Sangre entera extraída con anticoagulante, orina, suero, leche materna o tejido homogeneizado. En los tres primeros casos se utilizarán 0,8 mL de muestra y se dejará difundir 1 hora (3 horas). Para tejido homogeneizado se precisarán 4 mL de muestra y se dejará difundir 4 horas a 37 °C ó 12 horas a temperatura ambiente.

Reactivos:

1. Solución saturada de carbonato de potasio: Disolver 112 g de carbonato de potasio en 100 mL de agua fría.
2. Solución sulfúrica de dicromato de potasio: Disolver 3,70 g de dicromato de potasio en 150 mL de agua destilada, adicionar cuidadosamente 280 mL de ácido sulfúrico concentrado y diluir hasta un volumen final de 650 mL con agua destilada.
3. Solución patrón de etanol 4 g/L: Diluir 0,5 mL de etanol absoluto en 100 mL de solución fisiológica o agua destilada en su defecto. A partir de ella realizar las diluciones con el fin de obtener patrones de 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 y 2,4 g/L y realizar una curva de calibrado.

Actividades a Desarrollar

Microdifusión

Preparar dos celdas de Conway (ver Figura 1, página 3) para muestra y testigo con sus respectivas tapas con vaselina y trabajar con las mismas simultáneamente.

1- Para la MUESTRA, en una celda de Conway adicionar:

- ✦ En la cámara central: 2 mL de solución sulfúrica de dicromato de potasio.

- ✦ En la cámara externa: 1 mL de solución saturada de carbonato de potasio en un sector de la cámara externa y 0,8 mL de muestra (sangre) en el sector opuesto al que se agregó la solución anterior.

2- Para el TESTIGO, en una celda de Conway adicionar:

- ✦ En la cámara central: 2 mL de solución sulfúrica de dicromato de potasio.
- ✦ En la cámara externa: 1 mL de solución saturada de carbonato de potasio en un sector de la cámara externa y 0,8 mL de solución testigo en el sector opuesto al que se agregó la solución anterior.

Tiempo de difusión: 1 hora a temperatura ambiente (3 hs).

3- Para el BLANCO se procederá de la siguiente forma: en un tubo de ensayo o probeta graduados se colocan 2 mL de solución sulfúrica de dicromato de potasio y se llevan a un volumen final de 10 mL con agua destilada.

Determinación cuantitativa

Una vez transcurrido el tiempo de difusión, se transfiere el contenido de las cámaras centrales en forma cuantitativa, lavando las cámaras con pequeños volúmenes de agua destilada, varias veces y recogiendo el líquido de lavado con una pipeta. Llevar el contenido a tubos graduados y se llevan a un volumen final de 10 mL. De esta forma quedan 3 tubos graduados con un volumen final de 10 mL, uno para el Blanco preparado en el punto 3, uno para la Muestra y otro para el Testigo.

Las lecturas de la absorbancia se realizarán a 500 nanómetros.

Cálculos

$$(\Delta \text{ blanco} - \Delta \text{ muestra}) \times F = \text{mg etanol/dL}$$

$$F = \frac{\text{Concentración del testigo mg/dL}}{(\Delta \text{ blanco} - \Delta \text{ testigo})}$$

Referencias

Fiorenza Biancucci G., González D., Pérez A., Ridolfi A., Strobl A., 2008. *“Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos para Laboratorios de Baja Complejidad”*. Publicado por Asociación Toxicológica Argentina ISBN: 978-987-24163-0-0 Bs. As. Argentina.

Preedy V., Watson R., 2004. *“Comprehensive Handbook of Alcohol Related Pathology”*. Elsevier.

Lorenzo Fernández P., Ladero Quesada J. M., Leza Cerro J. C., Lizasoain Hernández I., 2009, *Drogodependencias: farmacología, patología, psicología, legislación*. Editorial Médica Panamericana.

Monica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. *Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología*. Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Ley de Tránsito, Ley N° 24.449

Ley Nacional de Lucha contra el Alcoholismo N° 24.788

Gisbert Calabuig, J. A. 2004. *“Medicina Legal y Toxicología”*. Masson-Salvat medicina.

Trabajo práctico de Laboratorio N.º 2

Monóxido De Carbono

Objetivos

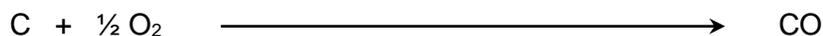
- Conocer e interpretar los riesgos de la generación de CO en ambientes domésticos.
- Determinar monóxido de carbono en sangre mediante la técnica de microdifusión.
- Realizar cálculos de concentración de CO ligado a hemoglobina e interpretar los resultados.

Introducción Teórica

El monóxido de carbono es un gas incoloro e inodoro al estado puro. Es origen de gran número de intoxicaciones al no darse cuenta la víctima del peligro que la amenaza. Se difunde con gran facilidad en la atmósfera de ambientes cerrados, debido a su densidad similar a la del aire, alcanzando concentraciones tóxicas casi simultáneamente en todos los niveles.

Las fuentes de intoxicación provienen principalmente de combustiones incompletas. La combustión de la materia orgánica da lugar a la formación de dióxido de carbono. Sin embargo, cuando el aporte de oxígeno es insuficiente para oxidar por completo al carbono, se forma monóxido de carbono.

Formación de monóxido de carbono



También se puede producir la reducción del anhídrido carbónico, procedente de la combustión completa del carbono, perdiendo un átomo de oxígeno. Esto sucede cuando los gases inciden sobre una superficie amplia y fría, o cuando entra en combustión una gruesa capa de combustible, como el carbón, por ejemplo, de modo que los gases desprendidos en la capa inferior pasan por las capas superiores, calientes, pero no en combustión.

Las principales materias orgánicas, fuentes de monóxido de carbono por combustión incompleta son:

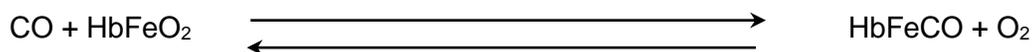
- Combustibles sólidos: carbón mineral y vegetal, madera, leña, plásticos, etc.
- Combustibles líquidos: hidrocarburos derivados del petróleo, naftas, gas oil, gas natural.
- Explosivos.
- Tabaco. Si bien el fumar tabaco no contribuye de forma apreciable a aumentar la concentración de monóxido de carbono en la atmósfera, los fumadores están expuestos a los efectos tóxicos del gas.

La etiología de las intoxicaciones por monóxido de carbono es predominantemente accidental, y se debe a procesos de combustión incompleta. Esto ocurre especialmente cuando los sistemas de calefacción domésticos (como estufas, braseros y calefactores) funcionan de manera defectuosa, especialmente en presencia de quemadores sucios o mal mantenidos. Asimismo, puede producirse una emisión peligrosa de monóxido de carbono cuando las hornallas y los hornos de cocina tienen una toma de aire insuficiente. En el contexto de incendios, una proporción significativa de las víctimas fallece por intoxicación con este gas, antes incluso de sufrir quemaduras graves.

Es difícil establecer dosis tóxicas absolutas de monóxido de carbono, dado que dependerán principalmente de dos variables, la concentración que alcanza el gas en el ambiente, y el tiempo de exposición al mismo. Sin embargo, se han establecido concentraciones de monóxido de carbono en la atmósfera que siempre son peligrosas. Así, 0,2 % de CO en la atmósfera conduce a efectos tóxicos, mientras que concentraciones superiores a 1 % pueden llegar a ser mortales.

El monóxido de carbono es un tóxico sanguíneo, que actúa combinándose con la hemoglobina, formando el compuesto estable carboxihemoglobina, la cual es incapaz de transportar oxígeno.

Formación de carboxihemoglobina hemática



El sitio de unión de monóxido de carbono en el grupo Hem de la hemoglobina se puede observar en la Figura 3. La molécula de hemoglobina consta de cuatro cadenas de Globina, cada una de las cuales posee un grupo Hem. Cada Hem posee un átomo de Fe con índice de coordinación 6. A través de los cuatro primeros enlaces, el Fe se une a los cuatro nitrógenos del Hem. En el 5^{to} enlace se combina con globina y en el 6^{to} se ubica CO, sitio que normalmente es ocupado por O₂.

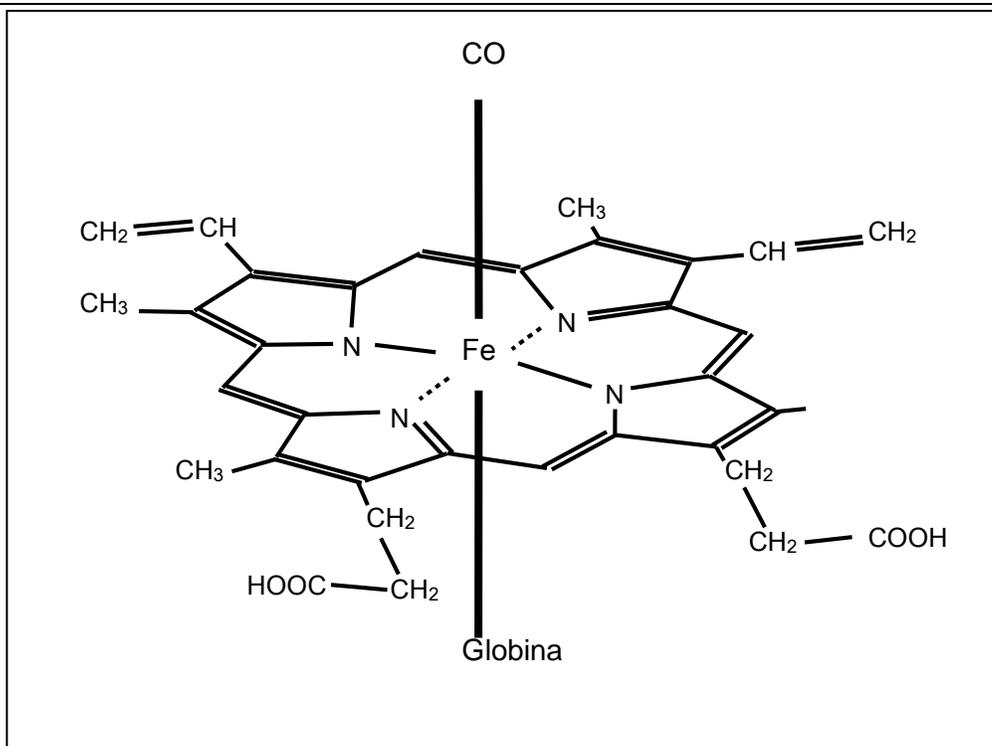


Figura 2. Sitio de acción del CO.

La hemoglobina tiene una afinidad por el monóxido de carbono 250 veces mayor que por el oxígeno, por lo que bajas concentraciones de CO pueden bloquear grandes cantidades de hemoglobina.

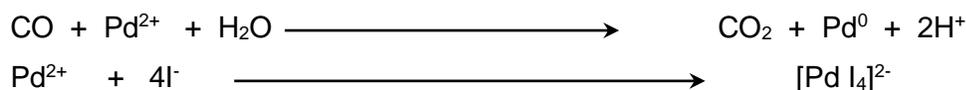
Este mecanismo de acción de monóxido de carbono descrito produce principalmente una asfixia tisular. El sistema nervioso, debido a su mayor demanda de oxígeno, es el primero en acusar los efectos, y el que más sufre los efectos de la intoxicación por CO. Se han descrito formas sobreagudas de intoxicación por monóxido de carbono, en los cuales el cuadro evoluciona con extrema rapidez, la víctima cae al suelo, tiene algunas convulsiones y fallece de modo inmediato. En los casos corrientes la evolución es más lenta y se observan tres periodos. El primer periodo, precomatoso, se caracteriza por cefaleas, latidos en los temporales, calor, mareos, náuseas y vómitos. En este periodo es característica la debilidad o parálisis de las extremidades inferiores que impiden al intoxicado abandonar la habitación, parálisis que es ascendente. Al periodo precomatoso le sucede uno comatoso en el que se acentúan los síntomas descritos que evoluciona en un coma profundo con abolición total de los reflejos y con respiración débil. Un efecto característico son las manchas rosadas en la superficie corporal. Luego de este periodo, si se no se asiste rápidamente a la víctima, se produce la muerte, por trastornos respiratorios primero, y circulatorios después. Si se sobrevive, el sujeto pasa al periodo poscomatoso, donde quedan secuelas de la intoxicación, como cefalalgia,

confusión mental, amnesia, debilidad muscular, etc. Luego de una intoxicación aguda pueden quedar secuelas en la piel, pulmones, sistema nervioso y endócrino y posible aparición de un Síndrome del Síntoma Recurrente en el que ocurren recidivas de los síntomas sufridos durante la intoxicación y un Síndrome Neurológico Tardío con trastornos en el sueño, carácter y pérdida de habilidades prácticas e intelectuales.

El tratamiento consiste principalmente en la extracción del intoxicado de la atmósfera contaminada con CO. Posteriormente se continúa con la administración de oxígeno y de ser necesario oxígeno hiperbárico, con monitoreo médico. También se pueden suministrar sustitutos de la hemoglobina, como la tionina.

Fundamento de la Técnica de Determinación de Monóxido de Carbono

El monóxido de carbono es liberado de la muestra (sangre entera) por el agregado de ácido sulfúrico al 10 % (v/v), luego difunde a la cámara central donde reacciona como reductor frente al cloruro de paladio, determinando así la formación de un espejo de paladio. Posteriormente con ioduro de potasio al 15 %, que reacciona con el Pd²⁺ remanente, se forma un complejo color rojo que puede leerse espectrofotométricamente.



Materiales y Métodos

Muestra: sangre entera, utilizando anticoagulantes heparina o EDTA.

Reactivos:

1. Cloruro de paladio: Disolver 0,2 g de cloruro de paladio en 250 mL ácido clorhídrico 0,01 N, calentar si es necesario.
2. Ácido sulfúrico al 10 % (v/v).
3. Goma arábiga al 0,1 % (p/v).
4. Ioduro de potasio al 15 % (p/v).

Actividades a Desarrollar

Microdifusión

Preparar una celda de Conway (ver Figura1, página 3) con su respectiva tapa con vaselina y proceder de la siguiente forma.

- ✦ En la cámara central: Adicionar 2 mL de cloruro de paladio.
- ✦ En la cámara externa: Adicionar 1 mL de ácido sulfúrico al 10 % en un sector de la cámara externa y luego 1 mL de muestra (sangre) en el sector opuesto de la misma cámara.

Tiempo de difusión: Inmediatamente luego del agregado de los reactivos en la celda de Conway, se tapa herméticamente la misma con la placa de vidrio y se deja difundir durante 1 hora (3 horas) a temperatura ambiente.

Determinación cuantitativa

Preparación del tubo muestra

- 1- Con pipeta capilar o tipo Pasteur, transferir la solución de la cámara central a un tubo de centrífuga.
- 2- Centrifugar.
- 3- Tomar 0,1 mL (100 μ L) del sobrenadante y transferirlos a un tubo graduado de 10 mL.
- 4- Adicionar 1 mL de goma arábica al 0,1 %.
- 5- Adicionar 1 mL de ioduro de potasio al 15 %.
- 6- Llevar a un volumen final de 10 mL con agua destilada, mezclar por inversión.

Preparación del tubo Blanco

En un tubo graduado de 10 mL colocar 0,1 mL de cloruro de paladio y continuar igual que en el tubo muestra en los pasos 4, 5 y 6. De esta forma quedan dos tubos graduados (uno blanco y uno muestra) con un volumen final de 10 mL. Determinar la absorbancia de las soluciones contenidas en ambos tubos a 500 nanómetros.

Cálculos

$$\frac{(\Delta \text{ blanco} - \Delta \text{ muestra}) \times 27,75}{\Delta \text{ blanco}} = \text{mg de CO \%}$$

$$\frac{(\Delta \text{ blanco} - \Delta \text{ muestra}) \times 27,75 \times 0,8}{\Delta \text{ blanco}} = \text{mL de CO \%} = C$$

Este último valor lo denominamos C

Para expresar los resultados en % de saturación de Hemoglobina, es necesario conocer el tenor de Hemoglobina de cada una de las muestras de sangre con las cuales estamos trabajando. Este dato será denominado A

Luego se realizan los siguientes cálculos:

1 gramo de hemoglobina fija ————— 1,34 mL de CO

A gramos de hemoglobina fijan ————— B mL de CO

Luego:

B mL de CO ————— 100 % de saturación

C mL de CO ————— X= % de saturación

Referencias

Gisbert Calabuig, J. A., 2004, *Medicina Legal y Toxicología*. Masson-Salvat medicina. 4ta ed.

Fiorenza Biancucci G., González D., Pérez A., Ridolfi A., Strobl A., 2008. *Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos para Laboratorios de Baja Complejidad*. Publicado por Asociación Toxicológica Argentina ISBN: 978-987-24163-0-0 Bs. As. Argentina.

Penney D. G., 2000, *Carbon Monoxide Toxicity*. CRC Press.

Monica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. *Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología*. Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 3

Metanol

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de la técnica de microdifusión.
- Adquirir destreza en la ejecución de la técnica de microdifusión y en el manejo de tóxicos volátiles, ponderando y evitando posibles fuentes de error.
- Determinar metanol en muestras de interés toxicológico, forense y legal.
- Interpretar los resultados acordes al marco legal vigente.

Introducción Teórica

El alcohol metílico o metanol, también conocido como "alcohol de madera o alcohol de quemar", se utiliza industrialmente en la fabricación de disolventes de pinturas y barnices, anticongelantes de automóviles, solventes de laca, líquidos de fotografía o aditivo de combustibles. En los hogares se le emplea como fuente de calor o se encuentran como parte de productos comerciales. Además, existe un uso fraudulento de éste como sustituto del etanol en bebidas alcohólicas fabricadas de manera clandestina.

El metanol está presente en muy bajas concentraciones en bebidas alcohólicas. También se encuentra normalmente en la dieta de seres humanos, en frutas frescas y vegetales, donde se encuentra como alcohol libre, metil ésteres de ácidos grasos, o como grupo metóxido en la pectina.

De las potenciales rutas de exposición, la ingestión de metanol como sustituto de etanol es la más corriente de las intoxicaciones por metanol en seres humanos ya sea de forma accidental o deliberada. También se producen intoxicaciones de etiología ocupacional, a través de inhalación o vía dérmica. En humanos el metanol es rápidamente absorbido en el cuerpo por todas las rutas de exposición. Debido a que es soluble en agua, se distribuye principalmente en los tejidos con mayor concentración acuosa.

El metanol es metabolizado a formaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en humanos. El formaldehído es convertido a ácido fórmico, y este a su vez a formiato e ión hidrógeno por la enzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) formaldehído deshidrogenasa. El formiato es convertido a dióxido de carbono y agua por el enzima ácido fórmico deshidrogenasa. La saturación de esta última, conduce a un incremento de formiato e ión hidrógeno en la sangre, resultando en acidosis y toxicidad asociada a la exposición de metanol en humanos. En la orina aparece un fuerte olor a formaldehído.

Los síntomas de la intoxicación por metanol en humanos comienzan por el sistema nervioso central (SNC), con efectos como depresión, dolor de cabeza, mareos, náuseas y vómitos, o simplemente un estado de embriaguez similar al de la intoxicación etílica. Luego de 12-24 horas, los síntomas disminuyen, y aparecen trastornos visuales, que presenta visión borrosa referida "como caída de copos de nieve", disminución de la agudeza visual y fotofobia. Al examen físico las pupilas están dilatadas. Si la exposición se produjo por vía oral, por lo irritante del producto se producen náuseas, vómitos, epigastralgia o manifestaciones clínicas de una pancreatitis aguda. La mortalidad se relaciona con el grado de acidosis y los niveles de formiato.

Para el tratamiento de la intoxicación por metanol se emplea etanol, debido a que la enzima tiene 10 veces más afinidad por etanol, por lo tanto, compite y ralentiza el metabolismo de metanol. La droga Fomepizole, es un potente inhibidor de ADH, inhibiendo de esta manera el metabolismo de metanol. Ambos, etanol y Fomepizole son usados en la intoxicación por metanol, disminuyendo el metabolismo de metanol, y previniendo la formación de ácido fórmico, el metabolito tóxico de metanol que produce la acidosis, daño neuronal, efectos a la visión, y eventualmente la muerte.

El tratamiento para prevenir ceguera y muerte depende de un diagnóstico rápido de la intoxicación por metanol, el cual consiste en la demostración en el plasma del metanol, técnica que debiera existir en todos los hospitales por lo grave de la intoxicación y las posibilidades terapéuticas con el antídoto.

Fundamento de la Técnica de Determinación de Metanol

El metanol contenido en el material biológico es liberado por el agregado de una solución saturada de carbonato de potasio, posteriormente difunde desde la cámara externa de la celda de Conway hacia la cámara central, donde es absorbido por una solución de ácido sulfúrico al 10 %. Este proceso se produce por la insolubilidad de metanol en la solución saturada de carbonato de potasio, lo cual permite liberarlo de la muestra, y la gran solubilidad en ácido sulfúrico diluido, lo cual permite fijarlo. La recuperación es sólo del 82 %. La determinación cuantitativa se realiza transformando el metanol en metanal por acción de permanganato de potasio, luego sulfito ácido de sodio para eliminar el exceso de permanganato y por último se agrega ácido cromotrópico que con el aldehído metanal y en medio fuertemente ácido y en caliente, forma un complejo coloreado, el cual se lee espectrofotométricamente.

Materiales y Métodos

Muestra: Puede utilizarse sangre entera extraída con anticoagulante, orina o tejido homogeneizado. En los dos primeros casos tomar 1 mL de muestra y difundir durante 3 horas. Para tejido se tomarán 5 mL de muestra y la difusión será de 5 horas.

Reactivos:

1. Ácido cromotrópico al 0,5 % (p/v).
2. Ácido sulfúrico concentrado.
3. Permanganato de potasio al 5 %.
4. Solución saturada de sulfito ácido de sodio: disolver 32,8 g de sulfito ácido de sodio en 100 mL de agua destilada a 0 °C.
5. Ácido Sulfúrico al 10 %.
6. Solución saturada de carbonato de potasio: disolver 112 g de carbonato de potasio en 100 mL de agua destilada fría.

Actividades a Desarrollar

Preparar una Celda de Conway con su respectiva tapa con vaselina (Ver Figura 1, Página 3) y procesar de la forma siguiente:

- ✦ En la cámara central: adicionar 2,2 mL de ácido sulfúrico al 10 %.
- ✦ En la cámara externa: adicionar 1 mL de carbonato de potasio en un sector de esta cámara y 0,5 mL de muestra en el sector opuesto al que se agregó la solución anterior.

Tiempo de difusión: 3 horas a temperatura ambiente.

Determinación cuantitativa

Se procesará un tubo muestra y un tubo blanco.

Tubo Muestra:

1. Transferir 0,1 mL de solución de la cámara central al tubo graduado de 10 mL, denominado tubo muestra.
2. Adicionar 1 gota de permanganato de potasio al 5 % y dejar 10 minutos.
3. Agregar 1 gota de sulfito ácido de sodio hasta decoloración del permanganato.
4. Adicionar 0,2 mL de ácido cromotrópico al 0,5 %.
5. Llevar a un baño de hielo y agregar lentamente 4 mL de ácido sulfúrico concentrado. mezclar.
6. Llevar a baño maría hirviente 15 minutos.

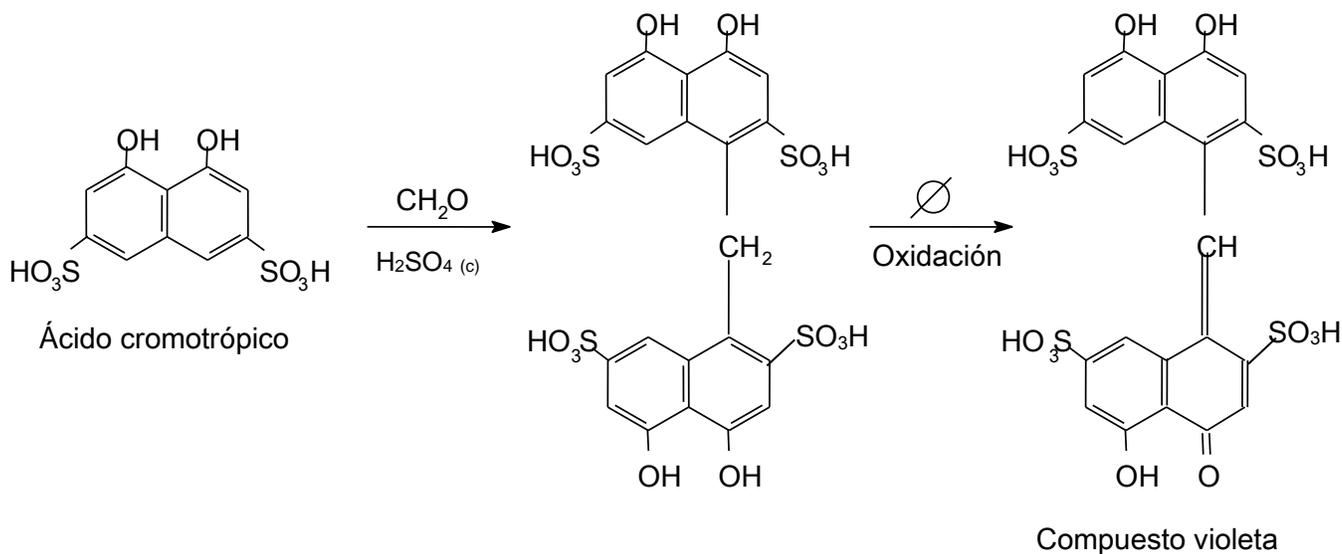
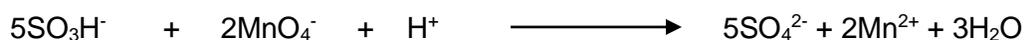
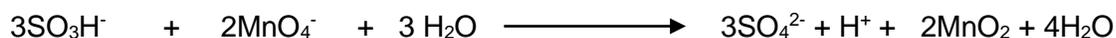
7. Enfríar y llevar a 10 mL con agua destilada.

Tubo Blanco:

Se realizan los mismos pasos que en el tubo muestra, sin el agregado de permanganato de potasio.

Una vez procesados los dos tubos se leerán sus absorbancias a 580 manómetros.

Reacciones:



Cálculos

Es necesario obtener una curva de calibración, realizada con patrones de metanol de concentraciones crecientes.

Luego.

$$\text{Absorbancia de la muestra} - \text{Absorbancia del blanco} = C$$

El valor hallado se multiplica por 2,2 que es un factor de dilución y por 1,21 que es un factor de corrección ya que la recuperación de metanol no es del 100%.

$$C \times 1,21 \times 2,2 = X$$

Llevar el valor X a la curva de calibración para obtener la concentración en la muestra.

Referencias

Gisbert Calabuig, J. A., 2004, *Medicina Legal y Toxicología*. Masson-Salvat medicina. 4ta ed.

Fiorenza Biancucci G., González D., Pérez A., Ridolfi A., Strobl A., 2008. *Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos para Laboratorios de Baja Complejidad*. Publicado por Asociación Toxicológica Argentina ISBN: 978-987-24163-0-0 Bs. As. Argentina.

Clary J. J., 2013, *The Toxicology of Methanol*, John Wiley & Sons, Inc.

Monica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. *Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología*. Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 4

Cianuros

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas de determinación cualitativa y cuantitativa.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas y en el manejo de tóxicos volátiles, ponderando y evitando posibles fuentes de error.
- Determinar cianuro en muestras de interés toxicológico, forense y legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

El ácido cianhídrico, es un líquido incoloro, altamente volátil, con una temperatura de ebullición de 26 °C. Es muy soluble en agua y alcohol. Tiene un fuerte y característico olor a almendras amargas. En los casos de intoxicación con HCN puro, estas se han producido por inhalación de sus vapores en el momento de su obtención, y este tipo de intoxicaciones son poco frecuentes en la actualidad, y ocurren principalmente en ambientes laborales. Ambientes en los cuales hay que ejercer un estricto cumplimiento de las normas de seguridad e higiene considerando la gravedad de las intoxicaciones con CNH que en general son mortales.

Sin embargo, existen una serie de sustancias que producen HCN bajo ciertas circunstancias, dando lugar a intoxicaciones tan rápidas como segundos si el cianuro es inhalado, o minutos, si este es ingerido. Estas sustancias son las sales cianuradas, nitrilos y glucósidos cianogenéticos.

Las sales cianuradas son las de mayor importancia toxicológica, cianuro de sodio y cianuro de potasio. Se disuelven en agua, de reacción alcalina y que, al reaccionar con ácidos, desprenden ácido cianhídrico. Tienen múltiples usos industriales, como el electroplatinado y el pulido de metales. También se emplean como insecticidas y plaguicidas.

Los nitrilos son una forma de cianuros encontrados en solventes y removedores de pegamentos y esmaltes para uñas. Acetonitrilo y propionitrilo son los nitrilos más representativos.

Los glucósidos cianogenéticos están contenidos en vegetales, tales como almendras amargas, semillas de melocotón o duraznos, del albaricoque o damascos, de la cereza, de los nísperos y de la ciruela, entre otras. En la ganadería es de importancia el sorgo. Estos glucósidos, cuya sustancia más significativa es la amigdalina, al descomponerse por enzimas presentes en los mismos vegetales, se hidrolizan, liberando el glucósido, ácido cianhídrico, y eventualmente aldehído benzoico. En los vegetales, los glucósidos y las enzimas capaces de

descomponerlos se encuentran en compartimentos diferentes, sin embargo, debido a trituración mecánica, como por ejemplo la masticación, basta para que estos se pongan en contacto, liberando cianuro. La dosis tóxica de los vegetales cianogénicos no se conoce, pero la bibliografía refiere que 60 almendras amargas pueden matar a un adulto, mientras que para un niño bastarán unas 7 o 10.

Otros casos de intoxicación por cianuros incluyen la inhalación de humo en incendios en espacios cerrados. Esta es la causa de intoxicación por cianuros más común. Materiales como lanas, sedas, plásticos, hules y polímeros sintéticos contienen carbono y nitrógeno capaz de producir ácido cianhídrico cuando son expuestos a elevadas temperaturas. Si bien en estos casos se asocia principalmente al monóxido de carbono, se ha demostrado que la intoxicación por cianuros contribuye independiente y marcadamente a enfermedad y muerte. También cabe mencionar la intoxicación cianhídrica por fuentes iatrogénicas, como la administración por vía endovenosa del antihipertensivo nitroprusiato de sodio.

El cianuro causa hipoxia intracelular, uniéndose reversiblemente a la citocromo oxidasa mitocondrial a_3 . Esta enzima es necesaria para la reducción del oxígeno a agua en el cuarto complejo de la fosforilación oxidativa. Una parte del cianuro también se une a la forma férrica de hemoglobina (metahemoglobina), que representa de un 1 a 2 % del total de hemoglobina. Este tipo de hemoglobina es incapaz de transportar oxígeno.

Sitio de Cianuro en el Grupo Hem A de la Citocromo “C” Oxidasa

La molécula del Complejo Citocromo C Oxidasa o Citocromo aa_3 consta de un grupo Hem A, que difiere del Hem de la hemoglobina en algunos sustituyentes. El Hem A posee un átomo de (Fe) en estado de oxidación Fe(II)/Fe(III) con índice de coordinación 6. A través de los cuatro primeros enlaces de coordinación, el Fe se une a los cuatro nitrógenos del Hem A. En el 5^{to} enlace se combina con la Proteína que forma parte del complejo y en el 6^o se ubica CN^- dejando al Fe como Fe(III) imposibilitando su reducción a Fe(II) (estado al que debe encontrarse Fe para que pueda realizarse la captación de O_2).

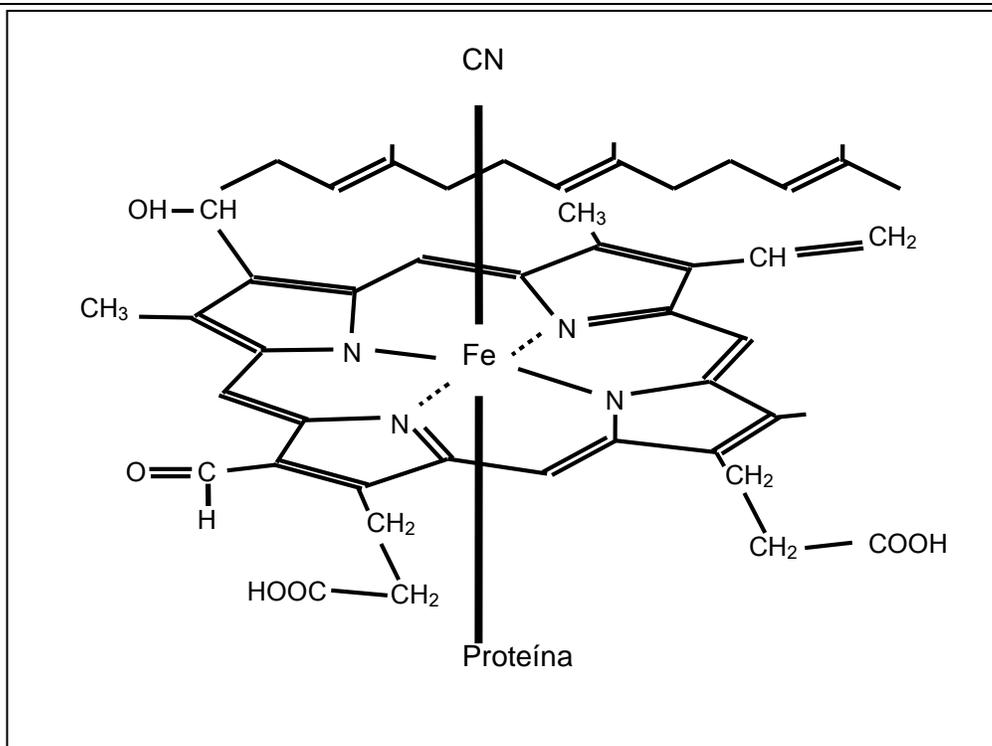


Figura 3. Sitio de Cianuro en el Grupo Hem A de la Citocromo “C” Oxidasa.

Los primeros síntomas incluyen ansiedad, cefalea, mareos, incapacidad de enfocar la visión, exoftalmia y midriasis. A medida que la hipoxia progresa, disminuye la conciencia, se producen convulsiones, conduciendo al coma. La respiración es rápida y profunda, y la piel toma un tono pálido.

En el hígado la enzima rodanasa, una sulfotransferasa, cataliza la conversión de cianuro a tiocianato, el cual es excretado por vía renal. Existe un kit antídoto para cianuro, el cual consiste en nitrito de amilo, nitrito de sodio y tiosulfato de sodio. Los dos nitritos son administrados para formar metahemoglobina, y está poder así unirse a cianuro. El tiosulfato de sodio actúa como donador de sulfidrilos para formar el tiocianato, la forma excretable de cianuro.

Fundamento de la Técnica de Determinación Cualitativa de Cianuros

Ensayo de Magnin: se basa en la formación del complejo ferrocianuro y posterior obtención de azul de Prusia, ferrocianuro férrico, por tratamiento ácido.

Materiales y Métodos

Muestra: sangre, vísceras y contenido estomacal.

Reactivos:

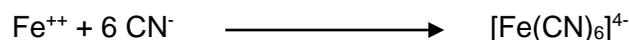
1. Hidróxido de sodio al 2 %.
2. Sulfato ferroso al 2 %, de preparación reciente.
3. Ácido clorhídrico concentrado.

Actividades a Desarrollar

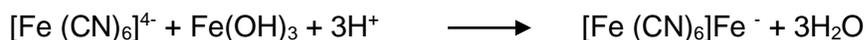
a) Tomar un trozo de papel de filtro e impregnarlo en hidróxido de sodio al 2 %, exponerlo en el interior del recipiente que contiene la muestra sin que esta tome contacto con el papel. Dejar unos minutos.



b) Retirar el papel y extenderlo sobre un vidrio de reloj. Adicionar 4 gotas de sulfato ferroso al 2 % de reciente preparación y dejar expuesto al aire unos minutos.



c) Adicionar gota a gota ácido clorhídrico concentrado, en presencia de cianuro aparecerá azul de Prusia.



Sensibilidad: 10 mg/L.

Fundamento de la Técnica de Determinación Cuantitativa de Cianuros

Método de Aldridge: si la muestra posee cianuro, se obtiene el aldehído glutacónico, el cual, en presencia de aminas primarias, se acopla a ellas dando compuestos coloreados de tipo base de Schiff, que pueden leerse espectrofotométricamente.

Materiales y Métodos

Muestras: sangre, vísceras y contenido estomacal.

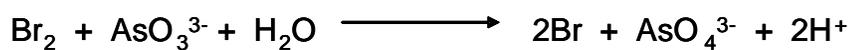
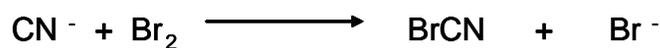
Reactivos:

1. Ácido tricloroacético al 5 %.
2. Agua de bromo.
3. Arsenito de sodio al 1,5 %: pesar 1,14 g de trióxido de arsénico, agregar 70 mL de agua destilada, más 5,5 mL de hidróxido de sodio 2,5 N. Agitar y calentar hasta disolución, llevar a volumen final de 100 mL con agua destilada.
4. Reactivo de piridina: tomar 50 mL de agua destilada y agregarle 5 mL de piridina y 2 mL de ácido clorhídrico concentrado. Llevar a 100 mL con agua destilada.
5. Clorhidrato de bencidina: disolver 2,5 g de clorhidrato de bencidina en solución acuosa de ácido clorhídrico al 2 % hasta completar 50 mL (solución saturada). Filtrar y diluir el filtrado 1 en 4 con agua destilada.

Actividades a Desarrollar

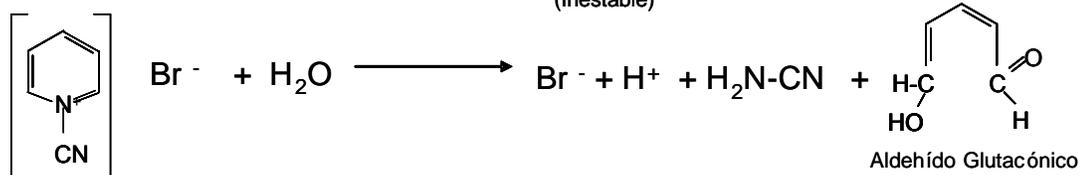
1. En un tubo de ensayo colocar 2 mL de sangre. Trabajar en paralelo con 2 mL de solución testigo. Adicionar 2 mL de ácido tricloroacético al 5 %, mezclar y filtrar.
2. Tomar 1 mL de filtrado y agregar 0,5 mL de agua de bromo y mezclar.
3. Adicionar 0,5 mL de arsenito de sodio al 1,5 %, mezclar bien.
4. Trasvasar el contenido a otro tubo que contenga 5 mL de reactivo de piridina y 0,2 mL de clorhidrato de bencidina. Si se forma un precipitado blanco, calentar hasta disolverlo.
5. Dejar en reposo 5 minutos y leer a 600 nanómetros.

Reacciones



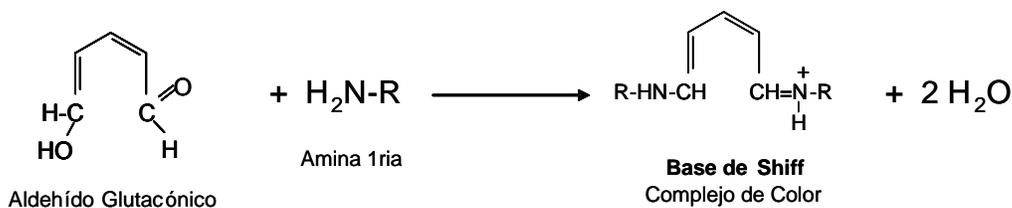
Piridina

Bromuro de Cianopiridina
(Inestable)



Bromuro de Cianopiridina
(Inestable)

Aldehído Glutacónico



Aldehído Glutacónico

Base de Schiff
Complejo de Color

Referencias

Fiorenza Biancucci G., González D., Pérez A., Ridolfi A., Strobl A., 2008. *Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos para Laboratorios de Baja Complejidad*. Publicado por Asociación Toxicológica Argentina ISBN: 978-987-24163-0-0 Bs. As. Argentina.

Jillian Hamel, 2011, A Review of Acute Cyanide Poisoning with a Treatment Update, *Toxicology, Critical Care Nurse*, 31 72-81.

Cameán A. M., Repetto M., 2006, *Toxicología Alimentaria*, Ediciones Díaz de Santos. Código Alimentario Argentino.

Monica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. "Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología". Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Gisbert Calabuig, J. A., 2004, *Medicina Legal y Toxicología*. Masson-Salvat medicina. 4ta ed.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 5

Salicilatos, Ácido Acetilsalicílico y Derivados

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas de determinación cualitativa y cuantitativa para salicilatos.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas.
- Determinar salicilatos en muestras de interés farmacológico, toxicológico y legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

La aspirina, ácido acetilsalicílico, es el analgésico, antipirético, antiinflamatorio más prescrito. En los EE UU se consumen de 10.000 a 20.000 toneladas anualmente. El ácido salicílico es irritante y sólo puede ser empleado externamente, por esta razón se han sintetizado varios derivados de este ácido para uso sistémico. Por ejemplo, la aspirina es un éster del ácido acético. La acción de los salicilatos depende principalmente del contenido de ácido salicílico, sin embargo, algunos de sus efectos son debidos a su capacidad de acetilar proteínas.

El mecanismo de acción de salicilatos se basa en la inhibición de la acción de la ciclooxigenasa por acetilación, de manera covalente, de un residuo de serina en su sitio activo. Esta enzima convierte el ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos, los cuales se transforman en prostaglandinas y tromboxanos, mediadores en procesos de dolor e inflamación.

Los salicilatos producen analgesia tanto a nivel periférico, donde se produce el dolor, como a nivel del sistema nervioso central. El nivel de analgesia es menor, comparado con los producidos por opiáceos, pero sin las modificaciones sensoriales y perceptivas provocadas por estos. Su efecto antitérmico es central y directamente ejecutado a nivel hipotalámico, donde suprimen la hipertermia provocada por pirógenos tanto tóxico como endógeno. La inhibición de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos provoca una reducción de su actividad vasodilatadora y quimiotáctica, de allí su acción antiinflamatoria.

Los salicilatos se emplean contra la fiebre, diversos tipos de dolores como los de cabeza, artritis, dismenorrea, neuralgias y mialgias. En todos los casos, su acción es sintomática, y no modifica en absoluto la evolución espontánea del proceso. También se emplea en enfermedades relacionadas con la hiperagregación plaquetaria, tales como trombosis arteriales. Esta acción es la que puede provocar hemorragias digestivas en casos de uso crónico de estos medicamentos.

Las reacciones adversas más frecuentes son de localización gastrointestinal, caracterizadas por pirosis, dispepsia, gastritis, dolor gástrico, diarrea y estreñimiento. Otras reacciones involucran una disminución de la función renal, filtración glomerular y perfusión, provocando síndrome nefrótico y nefritis.

La intoxicación por salicilatos se denomina salicilismo. Es una intoxicación moderada de carácter crónico que cursa con cefalea, vértigos, ruidos de oídos y dificultades para la audición. La intoxicación por sobredosificación se caracteriza por dos acciones principales de salicilatos: a) hiperventilación que provoca alcalosis respiratoria y b) desacoplamiento de la fosforilación oxidativa que produce hipertermia y producción de metabolitos ácidos. Los síntomas se caracterizan por hipertermia, deshidratación, acufenos, alteraciones neurológicas y diátesis hemorrágica. La dosis fatal de salicilato de sodio es de 10 a 30 g.

El tratamiento incluye lavado gástrico, carbón activado, hidratación, alcalinización con bicarbonato de sodio intravenoso. En casos agudos también puede ser necesario diálisis. Los salicilatos se eliminan principalmente por orina como ácido salicílico (75 %).

Fundamento de la Técnica

El ión salicilato, principal metabolito del ácido acetilsalicílico en presencia de sales férricas produce un complejo de color violeta. Espectrofotométricamente se determina su absorbancia, siendo esta función de la concentración de salicilatos en la muestra.

Materiales y Métodos

Muestras: plasma, suero y orina (también puede hacerse en sangre entera, pero se obtienen mejores resultados con plasma o suero).

Reactivos:

1. Solución de ácido nítrico 0,07 N ($d = 1,40$).
2. Reactivo de Trinder para orina: Solución al 1 % de nitrato férrico en ácido nítrico 0,07 N (también puede usarse cloruro férrico).
3. Ácido clorhídrico 1 N.
4. Reactivo de Trinder para sangre: Colocar 4 g de nitrato férrico y 4 g de cloruro mercuríco en un matraz de 100 mL. Agregar 12 mL de ácido clorhídrico 1N. Disolver las sales y diluir a 100 mL con agua destilada. Filtrar. Guardar a temperatura ambiente.
5. Solución madre o stock de ácido acetilsalicílico (200 mg%): Colocar 232 mg de salicilato de sodio, disolver y llevar a 100 mL en matraz aforado con agua destilada. Agregar unas gotas de cloroformo como conservante. Guardar en heladera. Desechar luego de 6 meses.

6. Solución testigo o de referencia de ácido acetilsalicílico al 20 mg%: Diluir 10 mL de la solución madre a 100 mL de agua destilada. Agregar unas gotas de cloroformo como conservante. Guardar en la heladera. Desechar luego de 6 meses.

Actividades y Desarrollar

Determinación cualitativa de salicilatos en orina

En un tubo de ensayo colocar 1 mL de orina y unas gotas del reactivo de trinder para orina. La presencia de un color violeta es indicio del ión salicilato.

Determinación cuantitativa de salicilatos

Nota: Para la determinación cuantitativa en sangre, se utilizará el reactivo de Trinder para sangre.

- Realizar el siguiente esquema:

Reactivos	Muestra Plasma o Suero	Blanco de Muestra	Testigo	Blanco de Testigo
Agua destilada	1,6 mL	1,6 mL	1,6 mL	1,6 mL
Solución testigo (20 mg%)	-	-	0,4 mL	0,4 mL
Orina	0,4 mL	0,4 mL	-	-
Ácido nítrico	-	2,0 mL	-	2,0 mL
Nitrato férrico (Reactivo de Trinder)	2,0 mL	-	2,0 mL	-

- Agitar suavemente, esperar 5 minutos y leer en espectrofotómetro a 540 nm. Los resultados se expresan en mg de ión Salicilato presentes en 100 mL de orina.

Sensibilidad: 5 mg%.

Referencias

Saraf S., 2008, *NSAIDs Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs an Overview*, PharmaMed Press.

Goodman Gilman A., Brunton L. L., Chabner A. C., Knollmann B. C., 2011, *Goodman & Gilman las bases farmacológicas de la terapéutica*, Mc Graw Hill.

Gisbert Calabuig, J. A. 2004. *Medicina Legal y Toxicología*. Masson-Salvat medicina.

Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. *"Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología"*. Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 6

Paracetamol

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas de determinación cualitativa y cuantitativa de paracetamol.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas.
- Determinar paracetamol en muestras de interés farmacológico, toxicológico y legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

El paracetamol, acetoaminofeno, es uno de los medicamentos sin receta médica más consumidos a lo largo de toda la vida de los seres humanos. Actualmente este es usado principalmente por sus efectos antipiréticos y analgésicos. El paracetamol surgió en los años 80s, cuando el consumo de aspirina disminuyó debido a su asociación con el síndrome de Reyes en niños, por lo que se convirtió en la alternativa de elección para ellos.

Paracetamol se diferencia principalmente en su capacidad de inhibir selectivamente a la ciclooxigenasa COX-2. Debido a esto, en promedio, tiene menor capacidad analgésica, sin embargo, es preferido debido a su mejor tolerancia. Como resultado, paracetamol no suprime inflamaciones severas como artritis reumática o gota aguda, pero inhibe inflamaciones menores, como la de extracciones de dientes.

El paracetamol no causa toxicidad gastrointestinal a dosis terapéuticas. Sin embargo, provoca hepatotoxicidad específica. Las sobredosis de paracetamol son bien conocidas por causar hepatotoxicidad grave, la cual puede conducir a la muerte, en pacientes que no son tratados adecuadamente con *N*-acetilcisteína. La intoxicación con paracetamol es la principal causa de falla aguda hepática en los EEUU y el Reino Unido. Dosis de 4 gramos por día pueden causar daño en hígado que requiera intervención médica.

a. Procedimiento para determinación cualitativa de paracetamol

Fundamento de la Técnica

El paracetamol y sus metabolitos son hidrolizados con ácido clorhídrico concentrado en caliente generando *p*-aminofenol el cual reacciona con *o*-cresol dando una coloración azul intensa en medio alcalino de hidróxido de amonio por producción de azul de indofenol.

Materiales y Métodos

Muestra: La orina sin conservantes debe mantenerse refrigerada a una temperatura de 4–8 °C. En estas condiciones, puede conservarse hasta una semana. Este método de conservación también puede aplicarse para la determinación de paracetamol en contenido gástrico y en residuos recolectados en la escena.

Reactivos:

1. Ácido clorhídrico (HCl) concentrado 36 %, densidad 1,18.
2. Solución de *o*-cresol (C₇H₈O): pesar 10 g de *o*-cresol y diluir a 1000 mL con agua destilada.
3. Solución de hidróxido de amonio 4 mol/L: medir 270 mL de hidróxido de amonio 28 %, densidad 0,898 y llevar a 1000 mL con agua destilada.

Se deben utilizar reactivos de grado analítico que cumplan con normas internacionales de calidad (ACS, ISO). Todos los reactivos deben ser almacenados en recipientes adecuados, con etiquetas que indiquen nombre del reactivo, fecha de preparación, concentración, disolvente de la solución y analista.

Actividades a Desarrollar

1. Colocar 0,5 mL de muestra, orina blanco y orina referencia, en sendos tubos de ensayo. Agregar en cada uno 0,5 ml de ácido clorhídrico, hervir 10 minutos y enfriar.
2. Medir 0,2 mL del hidrolizado del punto anterior y agregarle 1 ml de solución de *o*-cresol.
3. Agregar 2 mL de hidróxido de amonio a cada uno de los tubos y mezclar por 5 segundos.

Resultados: la presencia de *p*-aminofenol procedente de paracetamol y sus metabolitos se evidencia por un color azul intenso.

Sensibilidad: Este método es sensible para determinar cualitativamente paracetamol y sus metabolitos en las concentraciones generadas desde dosis terapéuticas de 500 mg o menores. La sensibilidad para *p*-aminofenol es de 1 mg/L.

Interferencias: Este ensayo da positivo con aminas aromáticas como anilina. La etilendiamina da color verde con esta prueba.

b. Método cuantitativo de determinación de paracetamol

Fundamento de la Técnica

El ácido tricloroacético precipita las proteínas, luego el tratamiento con ácido nitroso da derivados nitrados que se leen espectrofotométricamente.

Materiales y Métodos

Muestras: aplicable a muestras de plasma o suero

Reactivos:

1. Ácido tricloroacético 100 g/L.
2. Ácido clorhídrico 6 mol/L.
3. Nitrito de Sodio 100 g/L.
4. Sulfamato de amonio 150 g/L.
5. Hidróxido de sodio 6 mol/L.
6. Patrones: 0; 50; 100; 200 y 400 mg/L de paracetamol. Estas soluciones deben prepararse semanalmente si se conservan a 4 °C o sino guardar a -20 °C.

Actividades a Desarrollar

1. Agregar 2 ml de tricloroacético a 1 mL de muestra o patrón, mezclar y centrifugar por 5 minutos.
2. En un tubo agregar 1 mL de clorhídrico a 2 mL de nitrito de sodio y mezclar **¡Cuidado que emite vapores de NO₂! Trabajar bajo campana con extractor encendido.**
3. Agregar 2 mL del sobrenadante del paso 1 a la mezcla obtenida en el paso 2, mezclar y dejar 2 a 3 minutos a temperatura ambiente.
4. Agregar 2 mL de sulfamato de amonio gota a gota para remover el exceso de ácido nitroso ¡cuidado que forma espuma, por eso gota a gota!
5. Agregar 2 mL de hidróxido de sodio, mezclar con vórtex para eliminar burbujas y leer a 450 nm (mejor a 430 nm si el equipo lo permite) contra blanco de plasma.

Este método es útil dentro de la 4 a 24 horas de la ingestión.

Sensibilidad: 50 mg/L, pero si el suero es urémico puede ser de 100 mg/L o más.

Interferencias:

- Ácido salicílico: concentraciones de 1 g/L dan una concentración aparente de paracetamol de 50 mg/L.
- 4-amino salicílico: reacciona fuertemente dando, por ejemplo, una concentración aparente de paracetamol de 360 mg/L cuando 100 mg/L de 4-aminosalicílico están presentes.

- Levodopa: también interfiere y otras soluciones conteniendo *o*-cresol como preservante dan falsos positivos presente.

Referencias

Saraf S., 2008, *NSAIDs Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs an Overview*, PharmaMed Press.

Goodman Gilman A., Brunton L. L., Chabner A. C., Knollmann B. C., 2011, *Goodman & Gilman las bases farmacológicas de la terapéutica*, Mc Graw Hill.

Gisbert Calabuig, J. A. 2004. *Medicina Legal y Toxicología*. Masson-Salvat medicina.

Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento. 2004. *Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología*. Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 7

Arsénico

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas de determinación cuantitativa para arsénico.
- Adquirir destreza en la ejecución de la técnica.
- Determinar arsénico en muestras de interés toxicológico, forense y legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

El arsénico como tal, metálico, no es tóxico ya que no es soluble, sin embargo, puede serlo al estar revestido por una película de As_2O_3 . Son tóxicos los siguientes derivados de arsénico: arsenitos y arseniatos de sodio y potasio; $AsCl_3$, As_2O_3 , arsenitos y arseniatos de cobre y plomo, plaguicidas. El arsénico existe en tres estados de valencia: As (0): arsénico metaloide, As (III): estado trivalente o arsenito y As (V): pentavalente o arseniato. El arsénico inorgánico es generalmente más tóxico que el arsénico orgánico. Este elemento está ampliamente distribuido en la naturaleza: se halla en suelos y aguas. Tanto los compuestos inorgánicos como los orgánicos del As son inodoros y carecen de un sabor especial. La forma inorgánica pentavalente del As y el fosfato son análogos, esto hace pensar que el As (V) compite con el fosfato en los procesos de transporte activo; en consecuencia, el incremento de fosfato provoca disminución de la absorción de As en el intestino y la reabsorción tubular renal del arseniato. El arseniato puede también sustituir al fosfato en los cristales de hidroxiapatita del hueso.

A nivel bioquímico, el arseniato puede desacoplar la fosforilación oxidativa en las mitocondrias por sustitución del fosfato en la síntesis de adenosintrifosfato (ATP). También puede desacoplar la glucólisis por la formación de un compuesto disfuncional, el 1-arseno-3 fosfoglicerato en lugar del 1:3- difosfoglicerato. El As (III) reacciona muy rápidamente con los grupos sulfhidrilo de una gran variedad de enzimas y proteínas.

Las intoxicaciones por arsénico son de etiología suicida y criminal, muy poco frecuentes en la actualidad debido a las restricciones en su uso, y por ende su adquisición. Cuando ocurren, se deben principalmente a las características físicas de As que lo asemejan a otras sustancias de uso culinario, y debido a la ausencia de propiedades organolépticas. Los síntomas ocasionados por la intoxicación por As son inespecíficos y muy similares patologías digestivas.

As se absorbe por todas las vías incluso la piel. Después de su absorción, este se distribuye por todo el organismo, captado por el sistema retículo endotelial y el hígado, siendo estos órganos los más afectados. Debido a su afinidad por grupos sulfhidrilos de proteínas, y el desacople de la cadena de fosforilativa, el As ocasiona graves daños en la nutrición tisular, provocando hígado graso con ictericia, trastornos de la coagulación y anemia, y lesiones a nivel nervioso con apoplejías, encefalopatías y polineuritis por inhibición del metabolismo de glúcidos y lípidos.

Las dosis tóxicas además de depender de la susceptibilidad individual, dependerán también de la solubilidad de la sal que contiene As. Así, para ácido arsenioso y arsénico se absorben rápidamente, 0,15 a 0,20 g son dosis mortales. La resistencia a altas dosis es excepcional, pero encontramos algunas personas, llamados arsenicófagos que toleran considerables cantidades. En un ser vivo, As puede estar en concentraciones que van desde 0,1 a 0,3 mg, sin contar ectodermis y uñas donde el depósito es mayor.

Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico - HACRE.

Algunos suelos son más ricos en As debido a un depósito natural, por actividad geológica, principalmente de origen volcánico. Esto compromete áreas geográficas específicas y provoca cuadros de intoxicación crónica, de allí el nombre con el que se conoce: hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE). La contaminación de los cursos de agua en nuestro país, tanto superficial como profundo, constituye el principal problema ambiental generado por el As, con importantes limitaciones en el desarrollo socioeconómico de algunas provincias. Esta contaminación resulta perjudicial tanto para el consumo e higiene humanos como para el alimento de animales y el riego de los cultivos.

La alta afinidad de As por grupos sulfhidrilos de proteínas causa una acumulación en tejidos ricos en queratina, como piel, pelos y uñas. Esta acumulación en piel causa el principal síntoma de As en pacientes con HACRE, el cual se destaca por hiperhidrosis (palmas y plantas presentan sudoración asociada a prurito, eritema y disestesias), hiperqueratosis (lesiones verrugosas distribuidas en palmas y plantas, simétricamente), melanodermia (zonas de despigmentación de color gris pizarra y negruzca) y malignización, neoplasias, principalmente tumores cutáneos, denominados carcinomas de Jonathan Hutchinson.

Fundamento de la Técnica

Determinación cuantitativa de Arsénico por el método de Vasak - Sedivek

En un primer paso se practica una mineralización con el objeto de liberar el arsénico del material biológico. Luego es transformado en arsina y posteriormente reacciona con una

solución pirídica de dietilditiocarbamato de plata, provocando la formación de un complejo color rojo que es leído espectrofotométricamente.

Materiales y Métodos

Muestra: Este método puede usarse para determinar arsénico en orina, sangre, tejidos, pelos, uñas, agua y alimentos.

Mineralización según los tipos de muestra:

- Orina y agua: se recomienda el método sulfonítrico-perclórico, el cual se desarrolla posteriormente (pág. 35).

- Sangre: se toman 10 a 20 mL de sangre total, se adicionan 2,5 mL de ácido sulfúrico y 10 a 20 mL de ácido nítrico.

- Pelos y uñas: previo a cualquier tratamiento estas muestras deben someterse a una rigurosa limpieza; esta se hará en primer lugar por el agregado de acetona varias veces hasta que la misma se presente límpida. Posteriormente se hace un segundo lavado con hidróxido de sodio y agua bidestilada, para secar finalmente en estufa a 105 °C.

Luego del lavado, tomar 2 a 3 mL de ácido sulfúrico y 10 mL de ácido nítrico que se agregan sobre la muestra de a 2 mL calentando, de manera de regular el tratamiento oxidante; luego se añaden 7 gotas de ácido perclórico intensificando el calor, hasta alcanzar humos blancos por la formación de trióxido de azufre durante 20 minutos. El residuo sulfúrico, una vez frío, debe ser incoloro.

- Tejidos y pelos: para este tipo de muestras se recomienda dejar en contacto con 10 a 50 mL de ácido nítrico a temperatura ambiente durante 3 a 4 horas.

- Alimentos: usar una mezcla de óxido de magnesio-nitrato de magnesio en cápsula de sílice.

Reactivos:

1. Ácido clorhídrico concentrado.
2. Ácido sulfúrico concentrado.
3. Ioduro de potasio al 15 % (de preparación reciente).
4. SnCl_2 al 40 % en ácido clorhídrico al 60 %.
5. Granallas de cinc libres de arsénico (0,5 mm de diámetro).
6. Ácido nítrico.
7. Ácido perclórico.
8. Oxalato de amonio.
9. Acetato de plomo al 10%.

10. Dietilditiocarbamato de plata en piridina: pesar 500 mg de DDTC y se llevan a 100 mL con piridina.

Otra forma de prepararlo es: disolver 1,7 g de nitrato de plata en 100 mL de agua destilada. Disolver 2,3 g de dietilditiocarbamato de sodio en agua bidestilada. Enfriar ambas soluciones a temperatura inferior a 20 °C y mezclar lentamente agitando. Filtrar el precipitado amarillo limón de dietilditiocarbamato de plata y lavarlo bien con agua bidestilada fría. Se recomienda filtrar rápidamente por succión porque puede haber descomposición del derivado de plata. Desecar en desecador al vacío que debe conservarse a temperatura inferior a 30 °C El compuesto seco es estable a temperatura ambiente 6 meses. El color del precipitado debe ser amarillo limón pues un tono rosado es indicio de descomposición. Finalmente, el producto se pulveriza, se toman 500 mg y se disuelven en 100 mL de piridina de pureza analítica.

Conservación del reactivo: en frasco color caramelo, teniendo en cuenta una estabilidad de 8 meses en refrigerador.

Actividades a Desarrollar: constan de 3 pasos: a) Mineralización, b) Separación y c) Determinación.

a) Mineralización

1. Trabajar bajo campana con extractor encendido. En un balón de Kjeldahl colocar 100 mL de muestra (orina o agua) más 20 mL de ácido nítrico; dejar aproximadamente 12 horas y luego adicionar 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, calentando durante 5 minutos.
2. Adicionar entre 0,5 y 1 mL de ácido perclórico al 70 % mas 5 mL de ácido nítrico.
3. Agregar 0,5 mL de solución saturada de oxalato de amonio (se formarán humos blancos).
4. Adicionar 10 mL de agua destilada; calentar hasta humos blancos. Repetir esta operación 4 veces.

b) Separación (ver aparatos de vidrio Figuras 4 y 5 Pág. 35)

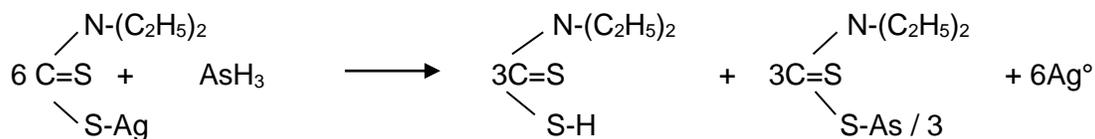
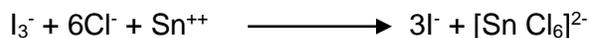
1. Tomar 20 mL de una muestra de agua con una pipeta de doble aforo (el producto de la mineralización se completa a 20 mL con agua destilada) y transferir al matraz generador de hidrógeno, adicionando luego 2 mL de ácido sulfúrico concentrado más 5 mL de ácido clorhídrico concentrado.
2. Agregar 2 mL de ioduro de potasio al 15 % y dejar 2 minutos en reposo.
3. Adicionar 0,5 mL de SnCl₂ al 40 % y dejar 10 minutos (20 minutos) en reposo.
4. Agregar al tubo colector el dietilditiocarbamato de plata en piridina.

5. Agregar 3 g de granallas de cinc libres de arsénico e inmediatamente conectar el tubo de desprendimiento, el cual quedar unido al matraz generador de hidrógeno por un tubo menor que contendrá un algodón embebido en acetato de plomo.
6. Se dejar burbujear 40 minutos (1 hora) sobre 6 mL de dietilditiocarbamato de plata en piridina, que están contenidos en el tubo receptor, trabajando con baño de hielo.

c) Determinación

Luego de los 40 minutos (la hora) de burbujeo, se lee la absorbancia de la solución a 540 nanómetros. Debe referirse este dato a una curva de calibración, realizada con patrones de arsénico de concentraciones crecientes.

Reacciones



Dietilditiocarbamato de Ag

Complejo rojo/violeta

Sensibilidad: 0,03 mg/L (ppm)

Aparatología de vidrio para determinación de Arsénico

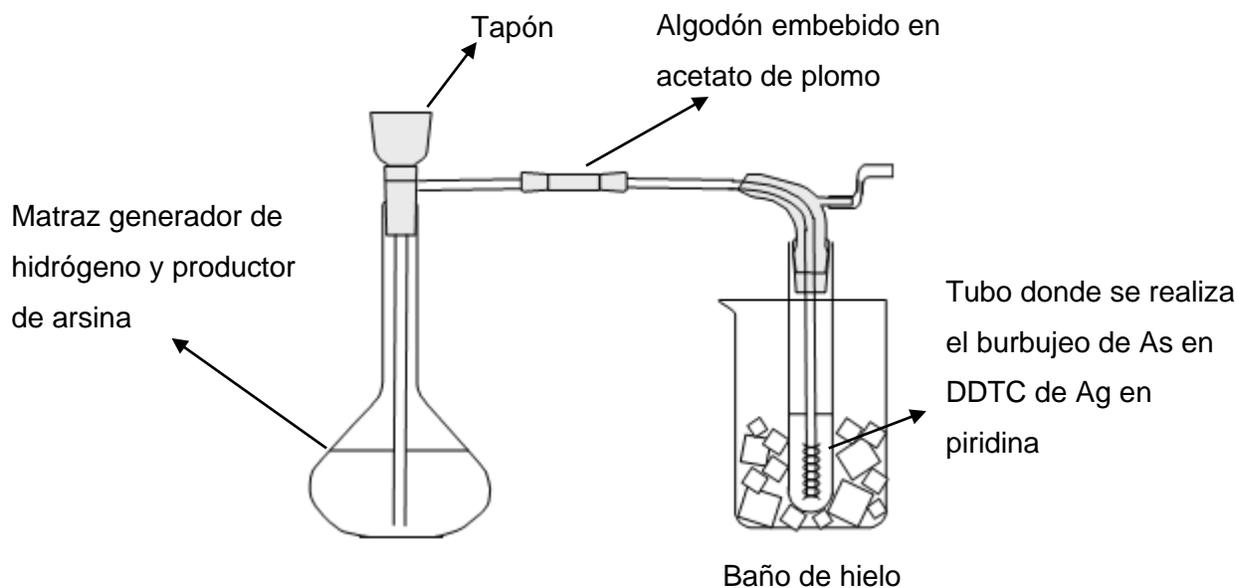


Figura. 4: Aparato U.N.S.L.

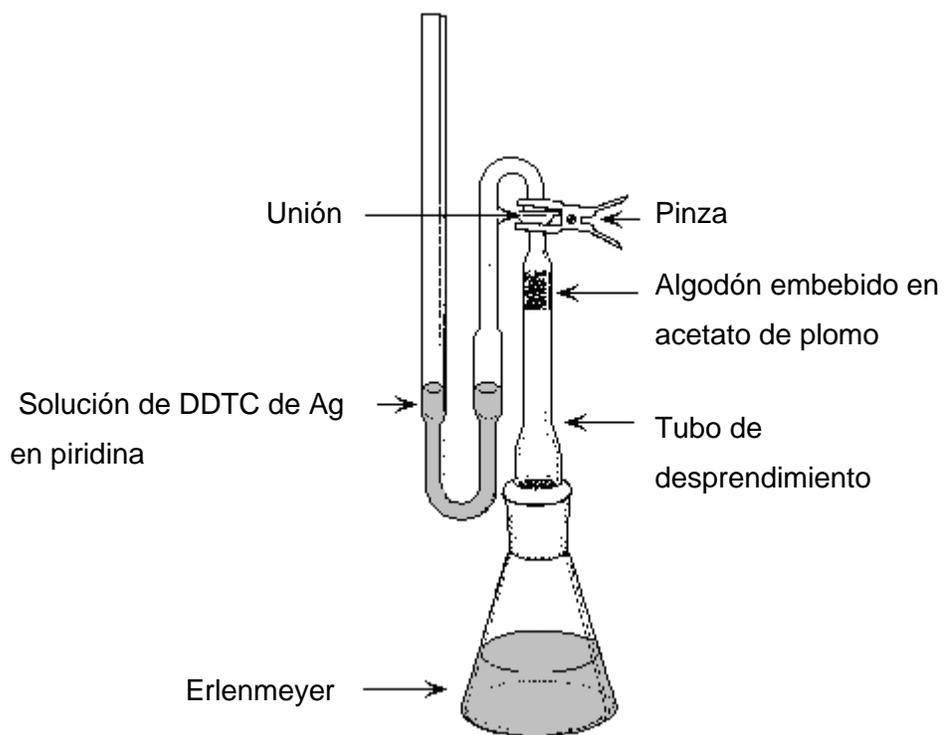


Figura. 5: Aparato I.V.A.

Referencias

- Gisbert Calabuig, J. A. 2004. *"Medicina Legal y Toxicología"*. Masson-Salvat medicina.
- Fiorenza Biancucci G., González D., Pérez A., Ridolfi A., Strobl A., 2008. *"Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos para Laboratorios de Baja Complejidad"*. Publicado por Asociación Toxicológica Argentina ISBN: 978-987-24163-0-0 Bs. As. Argentina.
- Hydroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE). Módulo: *Abatimiento d Arsénico. Serie: Tema de Salud Ambiental N.º 10. Programa Nacional de Minimización de riesgos por Exposición a Arsénico en Agua de Consumo Humano*. Edición 2012. Ministerio Salud – Presidencia de la Nación.
- González Diana y col. 2003. *"Arsénico en aguas de San Luis-Argentina. Uso de un equipo alternativo al de Gutzeit modificado"*, publicado en Acta Toxicológica Argentina, Julio de 2003. volumen 11, N.º 1, ISSN 0327-9286.
- González Diana y col. 2004. *"Arsénico en Aguas de Consumo Humano en Poblaciones de las Provincias de San Luis y Buenos Aires"*. Acta Toxicológica Argentina, Volumen 12, Página 43.
- González Diana y col. 1998. *"Monitoreo de arsénico en aguas subterráneas de San Luis. Delimitación de zona HACRE"*. Revista: Acta Toxicológica Argentina. Volumen 6, N.º 2, página 49.
- Ministerio de Salud de la Nación. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. Asociación Toxicológica Argentina. 2006. *Epidemiología de Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico en la Argentina*. Estudio colaborativo multicéntrico.
- Cameán A. M., Repetto M., 2006, *Toxicología Alimentaria*, Ediciones Díaz de Santos.
- Código Alimentario Argentino.
- Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. *"Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología"*. Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 8

Mineralización de Sangre y Análisis por Espectrometría de Masas con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-MS).

Objetivos

- Se describe en este método el procedimiento a seguir y el equipo necesario para la determinación de diversos metales en sangre por Espectrometría de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS). ICP-MS es una técnica de análisis inorgánico elemental que permite determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica en cantidades traza.

Fundamento de la Técnica

La sangre es recogida en tubos de polietileno con heparina o EDTA, posteriormente es digerida totalmente para determinación por ICP-MS.

Materiales y Métodos

Muestra: sangre, orina, tejidos.

Reactivos:

Todos los reactivos utilizados deben tener, como mínimo, la especificación "para análisis" y el agua para dilución debe ser Milli-Q o equivalente.

1. Peróxido de hidrógeno 30 %.
2. Ácido nítrico concentrado, 65 %.
3. Solución de calibración de metales para ICP MS.

Actividades a Desarrollar

Preparación de la muestra

1. Antes del análisis la sangre se homogeneiza mecánica o manualmente.
2. En un tubo falcon de 15 mL adicionar 500 µL sangre, y añadir 2 mL de ácido nítrico al 65 % v/v y 1 mL de Peróxido de Hidrógeno 30 % v/v. Simultáneamente se prepara un blanco adicionando en un tubo 2 mL de ácido nítrico y 1 mL de peróxido de hidrógeno.
3. Colocar los tubos con las tapas **sin ajustar** en un baño termostático a 97 °C por 40 minutos.

- Una vez completada la digestión enrazar los tubos a 10 mL con agua Milli-Q. Luego tomar 1 mL de esta dilución y colocarlo en un tubo nuevo llevándolo nuevamente a 10 mL con agua Milli-Q.

Preparación de la curva de calibración

Pipetear porciones de la solución estándar en diferentes tubos como se muestra en la siguiente tabla.

Tubos	Ácido nítrico 65 % v/v	Estándar
Tubo 1	100 µL	0 µL
Tubo 2	100 µL	2 µL
Tubo 3	100 µL	4 µL
Tubo 4	100 µL	8 µL
Tubo 5	100 µL	16 µL
Tubo 6	100 µL	32 µL
Tubo 7	100 µL	64 µL

Una vez adicionado todos los reactivos enrazar a 10 mL con agua Milli-Q.

Análisis por ICP-MS

El instrumento ICP-MS posee un automuestreador, por lo que no es necesario analizar los estándares y curvas de calibrado de forma manual. Para llevar a cabo el análisis se deben colocar los tubos de 15 mL destapados en el automuestreador, colocando primero los estándares y seguidamente las muestras.

El instrumento se controla a través de una PC, y un software específico provisto por el fabricante. Si bien el software varía acorde a cada fabricante, podemos definir algunos pasos del análisis que son comunes a todos los instrumentos ICP-MS.

- 1- Carga de estándares y reactivos: se debe indicar en el instrumento en que posición del automuestreador se han colocado los estándares y muestras.
- 2- Indicar que elemento se desea analizar.
- 3- Indicar diluciones. Se debe cargar las diluciones realizadas a las muestras.

4- Indicar el tiempo de lectura de la señal del elemento. A mayor tiempo de lectura, mayor será la exactitud del método.

5- Cargar el método de análisis. El análisis por ICP-MS requiere optimizar distintas variables a fin de obtener la máxima sensibilidad para el analito de interés. Entre las variables se encuentran el caudal del gas carrier (Ar), caudal de muestra, potencia de radiofrecuencia, etc. Los valores optimizados de cada variable están definidos por el método de análisis, por lo que debe establecerse el mismo antes de comenzar las mediciones.

6- Definir el archivo de salida. El software genera un archivo con el informe de análisis, y se debe indicar en que carpeta se desea que se guarde el mismo.

Interpretación de Resultados

La mayor parte del arsénico inorgánico y orgánico en sangre desaparece rápidamente en el hombre. Por lo tanto, el arsénico en sangre reflejará solamente la exposición por un corto período luego de la absorción y será dependiente del tiempo. Sólo si la exposición es continua y estable, como ocurre a veces cuando la fuente es el agua de bebida, el arsénico alcanzará cierta estabilidad en la sangre. A pesar de esto, no hay datos que indiquen una relación cuantitativa en el hombre entre la exposición al arsénico y las concentraciones sanguíneas. La corta vida media del arsénico en la sangre comparado con la vida media en el organismo, hace difícil discernir una relación entre la concentración sanguínea y la carga corporal total de arsénico, o las concentraciones de arsénico en otros órganos.

Estudios indican que concentraciones de arsénico de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en sangre, indican consumo de agua de bebida con $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de arsénico. El valor máximo permitido es de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ acorde al Código Alimentario Argentino.

Referencias

García, Susana Isabel - 1a ed. - Buenos Aires 2011. Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico HACRE: Módulo de Capacitación 2011. Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones.

Código Alimentario Argentino.

Associations between Blood and Urine Arsenic Concentrations and Global Levels of Post-Translational Histone Modifications in Bangladeshi Men and Women, 2016. Environ Health Perspect. Aug; 124(8): 1234–1240.

Practical Guide to ICP MS, A tutorial for beginners, CRC Press, 2008.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 9

Talio

Objetivos

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de varias técnicas de determinación cuantitativa y cualitativa para Talio, con y sin mineralización previa.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas.
- Determinar Talio en muestras de interés toxicológico, forense y legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

Tl existe en estados Tl^{1+} y Tl^{3+} , este último es un oxidante fuerte, y raramente es encontrado en la naturaleza. El talio se encuentra normalmente a bajas concentraciones en ambientes naturales, aunque existen excepciones. En ciertos lugares el Tl puede acumularse naturalmente, como resultado de la desmineralización de rocas ricas en este elemento. Talio también puede acumularse debido a actividades humanas, como la minería de cobre en la provincia de El Loa en el norte de Chile. Existen procesos que liberan Tl a la atmósfera como la fundición de minerales plomo, cobre y cinc, la combustión de carbón en plantas eléctricas, procesos de refinamiento de petróleo, y la producción de cemento.

Muchos compuestos de Talio tienen aplicaciones tecnológicas e industriales. A pesar de que sólo 15 toneladas de Tl son producidas anualmente, se estima que procesos industriales movilizan entre 2000 y 5000 toneladas cada año. Debido a propiedades tóxicas y fisicoquímicas, las sales de Tl se han empleado con fines bélicos. En medicina, el talio se ha empleado históricamente en el tratamiento de la sífilis, tuberculosis, malaria, y enfermedades del cuero cabelludo también en cremas depilatorias. Estas aplicaciones terapéuticas y cosméticas han sido discontinuadas como resultado de la toxicidad del metal. Actualmente, el isótopo ^{201}Tl es usado en el diagnóstico por imágenes de trastornos de miocardio y tumores. Muchos compuestos de talio son de interés industrial y comercial. El talio es empleado como anticorrosivo, aleaciones antifricción y en equipamiento eléctrico y electrónico como cables de fibra óptica, artefactos lumínicos, instrumentos infrarrojos, equipo láser, ozonómetros, industria del vidrio, termómetros de baja temperatura y semiconductores. También se usa en joyería, pirotecnia (color verde), y en la síntesis orgánica, de pesticidas y fertilizantes fosforados.

A pesar de que el talio no se usa más en la producción de rodenticidas, insecticidas o pesticidas, nuevos casos de intoxicación siguen reportándose, lo que sugiere que estas sustancias se siguen consiguiendo de manera clandestina. La etiología de la intoxicación por

talio puede ser de manera accidental, durante administraciones terapéuticas; ocupacional, como en las industrias de cementos, vidrios y electrónicos; e intencionalmente en envenenamientos. El talio es altamente tóxico, independientemente de la ruta de exposición, y es considerado uno de los metales más dañinos en mamíferos. La toxicidad de talio es comparable y en algunos casos mayores, que la de elementos como arsénico, cadmio, níquel, mercurio o plomo.

La exposición ocupacional a polvos o vapores que contienen talio causa síntomas tales como náuseas, dolor abdominal, y pérdida de apetito. Estos síntomas siguen con pérdida de cabello en todo el cuerpo, crecimiento anormal de uñas, neurotoxicidad (temblores en las manos, entumecimiento de pies, depresión y alteraciones de comportamiento), daños en el nervio óptico con dificultades en la visión, taquicardia y arritmias, y disnea que conducen eventualmente a la muerte. Otros aspectos de la salud afectados por la intoxicación por TI incluyen la fertilidad en mujeres y hombres.

Distintos mecanismos y modos de acción han sido propuestos para explicar la elevada toxicidad de talio. Debido a su baja tasa de eliminación, el talio tiende a acumularse en diferentes compuestos orgánicos en compartimentos celulares. El talio incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en células, pero el rol que Talio desempeña en estos mecanismos bioquímicos y celulares aún permanecen sin descifrar. Modelos animales y celulares sugieren que la toxicidad es disparada por lipoperoxidación, la cual es causada por la interferencia de TI en los mecanismos de defensa antioxidantes de las células. La toxicidad de talio también puede explicarse considerando las propiedades químicas similares de este a las de potasio. TI compite y reemplaza a K, modificando la activación de la Na^+/K^+ -ATPasa, piruvato quinasa, fructosa-1-6-bifosfatasa, y otras proteínas dependientes de iones metálicos. Este reemplazo le permite moverse a través de membranas, acumulándose en las células. El TI puede despolarizar las membranas, interfiriendo con la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, liberando el Ca endógeno. Estas reacciones conducen eventualmente al desacople de la fosforilación oxidativa en diferentes líneas celulares. También puede interferir con la estabilidad del ribosoma y la síntesis proteica. Otros mecanismos de toxicidad de TI incluyen interferencia en sitios activos de enzimas y la interacción con grupos amino-sulfhidrilos. Esta interacción de TI con proteínas explica muchas de las manifestaciones clínicas de la intoxicación por TI, como la alopecia y las anomalías en el crecimiento de uñas.

Los efectos tóxicos de TI pueden reducirse por administración de sales de potasio y agentes protectores de grupos sulfhidrilos como glutatión y DL-ditiotreitol. La administración de proteínas detoxificantes y sequestradoras de metales, como metalotioneínas, o la

administración de vitaminas E y C, eficientes antioxidantes, pueden aliviar la toxicidad de Tl. La toxicidad de este metal no puede ser contrarrestada por terapia quelante tradicional.

Las técnicas que posibilitan el hallazgo de talio en una muestra, se clasifican en dos grupos según el tratamiento previo de la misma.

a) Técnicas en las que puede trabajarse con o sin mineralización previa.

1) Técnica directa de Kovarin - Mouxka.

2) Técnica directa con rodamina B.

3) Técnica directa con ditizona.

b) Técnicas que requieren mineralización previa

1) Precipitación con ioduro de potasio.

2) Ensayo microcristalográfico con tiosulfato de talio.

3) Ensayo a la llama.

a) Actividades a desarrollar en las que puede trabajarse con o sin mineralización previa.

1) Técnica Directa: Kovarin - Mouxka

Fundamento de la Técnica

El Tl(I) presente en la muestra es oxidado a Tl(III) por acción del agua de bromo. Una vez oxidado forma un complejo con el ión cloruro aportado por el ácido clorhídrico y finalmente surge un derivado coloreado por el agregado de violeta de metilo, el cual se extrae con benceno.

Materiales y Métodos

Muestras: pueden tratarse muestras como orina y vísceras. En el primer caso, no es necesario mineralizar, pero en caso de vísceras se mineraliza con tratamiento sulfo-nítrico-perclórico.

Reactivos:

1. Ácido clorhídrico concentrado.
2. Agua de bromo.
3. Ácido sulfosalicílico al 20 %.

4. Benceno.
5. Violeta de metilo al 0,2 %.
6. Preparación del testigo: disolver 1.303 g de nitrato de talio, TINO en agua destilada. Agregar 10 mL de HNO₃ concentrado y diluir a 1 litro con agua destilada. 1 mL = 1 mg TI (1000 mg/L).

Actividades a Desarrollar

1. Tomar 3 tubos de ensayo y denominar **blanco, testigo y muestra**. En el tubo BLANCO colocar 2 mL de orina normal (que no contiene TI), en el tubo TESTIGO 2 mL de solución de Talio de concentración conocida y en el tubo MUESTRA 2 mL de orina del paciente (sospechosa de contener TI). Continuar trabajando en forma simultánea sobre los 3 tubos.
2. Adicionar 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado y 5 gotas de agua de bromo. Agitar y dejar reposar 2 minutos.
3. Agregar gota a gota y agitando, 5 gotas de ácido sulfosalicílico al 20 %, y por último agitar enérgicamente.
4. Adicionar 3 mL de benceno y 2 gotas de violeta de metilo al 0,2 %, y luego agitar enérgicamente. Dejar en reposo hasta separación de las fases acuosa y orgánica y observar coloración.

Describe los resultados:

Ensayo positivo

Fase orgánica superior:.....	Fase acuosa inferior:.....
------------------------------	----------------------------

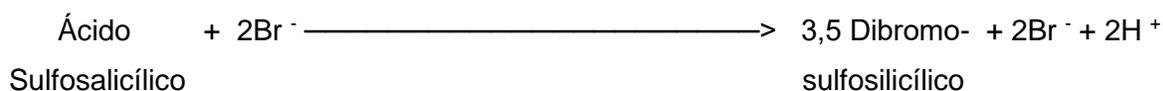
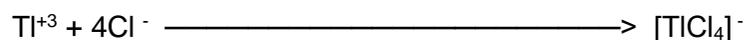
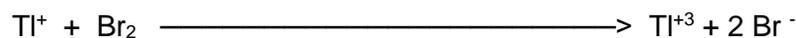
Ensayo negativo

Fase orgánica superior:.....	Fase acuosa inferior:.....
------------------------------	----------------------------

Resultado Negativo: capa orgánica superior incolora, capa acuosa inferior conserva el color del colorante.

Resultado Positivo: capa bencénica superior azul-violeta a violeta de intensidad variable y capa acuosa inferior color verde o amarillo de acuerdo a la acidez del medio.

Reacciones



El complejo coloreado que se forma finalmente es:



2) Técnica Directa con Rodamina b

Introducción Teórica

Posee el mismo fundamento que las técnicas explicadas anteriormente, con la diferencia que en este caso el derivado coloreado se forma con rodamina B que se extrae con benceno y la fase orgánica superior presenta fluorescencia rosada a la luz ultravioleta en caso de ensayo positivo, la capa acuosa incolora. En los casos fuertemente positivos hasta la capa acuosa puede presentar color rosado.

Materiales y Métodos

Muestras: orina y vísceras con las mismas consideraciones que para la técnica de Kovarin-Mouxka.

Reactivos:

1. Ácido clorhídrico concentrado.
2. Agua de bromo.
3. Ácido sulfosalicílico.
4. Benceno.
5. Rodamina B: 0,05 g de rodamina B más 15 g de cloruro de potasio, llevar a 100 mL con agua destilada.

Actividades a Desarrollar

1. Tomar 3 tubos de ensayo y denominar **Blanco**, **Testigo** y **Muestra**. En el tubo BLANCO colocar 5 mL de orina normal, en el tubo TESTIGO 5 mL de solución de talio de concentración conocida y en el tubo MUESTRA 5 mL de orina del paciente. Continuar trabajando en forma simultánea sobre los 3 tubos.
2. Adicionar 15 gotas de ácido clorhídrico concentrado y 20 gotas de agua de bromo. Agitar y dejar reposar 2 minutos.
3. Agregar gota a gota y agitando, 5 gotas de ácido sulfosalicílico al 20 %, y por último agitar enérgicamente.
4. Adicionar 4 gotas de rodamina B y luego 3 mL de benceno; agitar, decantar observar coloración y finalmente en lámpara de Wood (UV).

Describe los resultados:

Ensayo positivo

Fase orgánica superior.....	Fase acuosa inferior:.....
-----------------------------	----------------------------

Ensayo negativo

Fase orgánica superior.....	Fase acuosa inferior.....
-----------------------------	---------------------------

3) Actividades a Desarrollar Directa Con Ditizona

Introducción Teórica

Formación de un complejo coloreado rojo-rosado que se extrae con cloroformo y puede cuantificarse leyendo en espectrofotómetro.

Materiales y Métodos

Reactivos:

1. Reactivo de cianuros: disolver 1,6 g de NaOH, 1,2 g de tartrato doble de sodio y potasio y 1,36 g de cianuro de potasio en 10 mL de H₂O destilada (**precaución con el uso de cianuro concentrado**).
2. Ditizona solución de 250 mg/L en cloroformo: pesar 0,012 g y diluirlos en 50 mL de cloroformo. La solución de ditizona a emplearse debe ser de preparación reciente.
3. Patrones de Talio: primeramente, se debe preparar una solución madre de Tl de 1 g/L. Para esto se pesan 0,6175 g de Tl₂SO₄ y se diluyen en 500 mL de agua destilada. A partir de esta solución se preparan los patrones de 0,1; 1,0; 5,0; y 10,0 mg/L por dilución.

Actividades a Desarrollar

1. Agregar 1 mL de reactivo de cianuro a 5 mL de orina/patrón en ampolla de decantación y mezclar por agitación enérgica.
2. Agregar 4 mL (2 mL) de ditizona y agitar enérgicamente.
3. Dejar reposar en el freezer por 20 minutos (5 minutos).
4. Descartar (y filtrar) la capa superior acuosa.
5. Medir el extracto a 480 nm contra blanco de orina normal. Referir resultados a curva de calibrado.

Resultados: un color rojo-rosado en la capa clorofórmica indica presencia de talio. Los datos de absorbancia obtenidos deben referirse a curva de calibrado.

Sensibilidad: la sensibilidad de la técnica es de 0,1 mg/L de talio.

B) Métodos Que Requieren Mineralización Previa.

Materiales y Métodos

Reactivos: para los 3 métodos a realizar

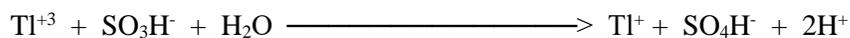
1. Solución saturada de sulfito ácido de sodio: disolver 32,8 g de sulfito ácido de sodio en 100 mL de agua destilada a 0 °C.
2. Ioduro de potasio al 10 %.
3. Tiosulfato de Sodio al 25 %.
4. Etanol de 96°.
5. Ácido clorhídrico concentrado.

Actividades a Desarrollar

1) Precipitación Con Ioduro de Potasio

Tomar 3 mL de solución mineralizada y agregar 2 gotas de solución saturada de sulfito ácido de sodio al 25 %, adicionar gota a gota solución de ioduro de potasio al 10 %. En caso positivo se observará la formación de un precipitado amarillo de ioduro de talio.

Reacciones



2) Ensayo Microcristalográfico Con Tiosulfato de Sodio

Colocar una gota de solución mineralizada en un porta objeto y evaporar a sequedad a baja temperatura. Repetir el proceso a los fines de concentrar TI^{3+} en caso que esté presente en la muestra. Adicionar una gota de tiosulfato de sodio al 25 % sobre el residuo seco y agitar con varilla fina. Por último, agregar una gota de etanol de 96° y observar al microscopio. En caso positivo se verán cristales de tiosulfato de talio en forma de agujas.

3) Ensayo a la Llama

Evaporar a sequedad en vidrio de reloj unos mL de solución muestra. Agregar una gota de ácido clorhídrico concentrado, tomar muestra con ansa y llevar a la llama. En caso positivo se observará por un instante la llama color verde esmeralda, fugaz.

Referencia

Gisbert Calabuig, J. A. 2004. "Medicina Legal y Toxicología". Masson-Salvat medicina.

Cameán A. M., Repetto M., 2006, Toxicología Alimentaria, Ediciones Díaz de Santos.

Código Alimentario Argentino.

Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores).
2004. "Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología". Editorial Eudeba. Buenos Aires-
Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 10

Mercurio

Investigación de Mercurio en Orina (Técnica Semi-cuantitativa)

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnica semicuantitativa para mercurio en orina.
- Adquirir destreza en la ejecución de la técnica.
- Determinar mercurio en muestras de interés toxicológico, laboral y legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

El mercurio, en su estado de oxidación 0, es el único metal en estado líquido a temperatura ambiente. Este líquido volátil libera gas monoatómico, comúnmente llamado vapor de mercurio. Es estable en el aire, y puede permanecer en la atmósfera por meses, y tal vez por años. En estado inorgánico Hg puede perder un electrón alcanzando el primer estado de oxidación, conocido como mercurio mercurioso o en su forma más común como cloruro, denominado calomel. Al perder 2 electrones, el mercurio alcanza el estado de oxidación +2, siendo el responsable de la formación de todos los compuestos orgánicos e inorgánicos de mercurio. La diferenciación entre mercurio orgánico e inorgánico es útil debido a diferentes propiedades toxicológicas de cada uno.

Los usos industriales de mercurio incluyen barómetros de mercurio y termómetros, como electrodo en la producción electrolítica de cloro y soda cáustica, y en interruptores eléctricos, los cuales son ampliamente usados en automóviles hoy en día. El vapor de mercurio encuentra amplia aplicación en lámparas de arco de mercurio y luces incandescentes. Los usos medicinales de mercurio incluyen al timerosal (salicilato de etil mercurio), un conservante empleado en vacunas, a pesar de las dudas en cuanto a su seguridad. El mercurio elemental es empleado en amalgamas en odontología. La exposición a compuestos organomercuriales, como el metilmercurio, proviene del consumo de pescados y mamíferos marinos. La metilación es producida por microorganismos presentes en los sedimentos de los cuerpos de agua dulces y océanos.

La química de mercurio está dominada por su elevada afinidad por grupos tiol. El Hg también posee afinidad por el selenio en su forma reducida aniónica, Se^{2-} . El HgSe, seleniuro mercúrico, es altamente insoluble, con un elevado tiempo de residencia los tejidos.

La ingestión de mercurio elemental como el proveniente de amalgamas dentales no presenta toxicidad, debido a que es pobremente absorbido en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, los vapores mercuriales provenientes de estas representan un riesgo para la salud. El mercurio inhalado atraviesa la barrera hematoencefálica, ocasionando daños al sistema nervioso central (SNC). Otras formas de mercurio pueden originar daño renal, incluyendo el síndrome nefrótico.

El mercurio mercúrico, en forma de sales hidrosolubles, es un veneno muy potente. La ingestión de tan sólo 1 gramo puede ser fatal. Esta forma de mercurio puede originar daño renal, incluyendo el síndrome nefrótico, y está relacionado con enfermedades del sistema inmune. Cierta resistencia a mercurio puede desarrollarse con repetidas exposiciones, debido a la inducción de *metalotioneínas*, proteínas con elevado número de grupos sulfhidrilos, expresadas bajo stress por metales pesados.

Los compuestos organomercuriales, como metil y etilmercurio, tienen como blanco de toxicidad al SNC. Los compuestos de etilmercurio se convierten rápidamente a mercurio mercúrico, causando daño renal, mientras que el metilmercurio es exclusivo del SNC.

El tratamiento de la intoxicación mercúrica consiste en terapia con quelantes.

Fundamento de la Técnica

En primer lugar, se realiza una mineralización sulfo-permangánica de la muestra de Orina. Luego se acondiciona la solución mineralizada para realizar la extracción clorofórmica del mercurio (II) complejado con ditizona o difeniltiocarbazona, complejo de color anaranjado. Por último, se hace una determinación semicuantitativa.

Materiales y Métodos

Reactivos:

1. Ácido sulfúrico concentrado.
2. Solución saturada de clorhidrato de hidroxilamina en agua bidestilada.
3. Solución saturada de permanganato de potasio en agua bidestilada.
4. Solución de urea: tomar 10 g de urea y disolver en 100 mL de agua bidestilada.
5. Acetato de sodio al 50 % en agua bidestilada.
6. EDTA: 2,5 g de EDTA en 100 mL de agua bidestilada.
7. Ditizona: tomar 0,1 g de ditizona y diluir en 100 mL de tetracloruro de carbono (conservar en heladera), esta es la solución madre. Diluir en el momento de usar 1 mL de solución madre en 35 mL de cloroformo.

8. Solución madre de mercurio de 100 µg/mL: disolver 67,7 mg de HgCl₂ en 500 mL de HCl 1/20.
9. Solución testigo de mercurio de 1 µg/mL: solución reciente por dilución de la solución madre, 1/100 en Agua bidestilada

Nota: en la bibliografía suele figurar la concentración de mercurio en gamas (γ): 1γ Equivalente a 1 µg/mL.

Actividades a Desarrollar

Técnica Semicuantitativa

a) Mineralización

- 1- En balón microkjedhal colocar 10 mL de orina muestra homogeneizada y adicionar 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Calentar a ebullición durante 10 minutos. Preparar un blanco reemplazando los 10 mL de muestra por 10 mL de agua bidestilada y trabajar con él en forma paralela desde el paso 1 hasta el 6 inclusive.
- 2- Por refrigerante agregar gota a gota solución saturada de permanganato de potasio hasta persistencia de color pardo oscuro durante 5 minutos.
- 3- Enfriar por refrigerante agregar 1 mL de solución saturada de clorhidrato de hidroxilamina y 2 mL de agua destilada. Calentar a ebullición durante 2 a 3 minutos. Debe quedar límpido y transparente.
- 4- Enfriar y completar el volumen hasta las 3/4 partes del balón con agua bidestilada.

b) Extracción

- 5- Llevar a una ampolla de decantación y adicionar 2 mL de solución de urea; 1 mL de EDTA. (o complexón IV) y 1 mL de acetato de sodio al 50 %.
- 6- Agregar 1 mL de ditizona, agitar bien y dejar en reposo. La presencia de mercurio se evidencia por la formación de un complejo color anaranjado. Separar la capa clorofórmica en un tubo de ensayo. Repetir hasta que el mililitro de ditizona permanezca color verde. Este mililitro no se reúne con el resto. En el caso del blanco el primer mililitro de ditizona permanece verde ya que no contiene mercurio.

c) Determinación

- 7- Hasta aquí tenemos un tubo blanco con 1 mL de ditizona color verde y un tubo muestra con varios mL de ditizona color anaranjado (la intensidad del color anaranjado depende del contenido de Mercurio en la muestra).
- Agregar al tubo blanco la misma cantidad de mL de ditizona que la adicionada al tubo muestra, menos 1 mL que ya contenía.

8- Trabajar sobre el tubo blanco adicionando gota a gota solución de mercurio de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1 γ/mL) desde una bureta y agitando luego de cada adición, hasta que el color del tubo blanco (originalmente verde) iguale el color del tubo muestra (anaranjada).

Cálculos

Los mL de solución de mercurio gastados son equivalentes a la concentración de mercurio que posee la muestra, ya que hay una relación directamente proporcional. Por ejemplo: si se gastaron 6 mL de solución de mercurio de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la muestra posee 6 μg de mercurio (tener en cuenta que estos 6 μg de mercurio están contenidos en 10 mL de muestra utilizados inicialmente, hacer los cálculos pertinentes para expresar en $\mu\text{g} \%$).

Referencias

Gisbert Calabuig, J. A. 2004. *"Medicina Legal y Toxicología"*. Masson-Salvat medicina.

Fiorenza Biancucci G., González D., Pérez A., Ridolfi A., Strobl A., 2008. *"Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos para Laboratorios de Baja Complejidad"*. Publicado por Asociación Toxicológica Argentina ISBN: 978-987-24163-0-0 Bs. As. Argentina.

Cameán A. M., Repetto M., 2006, *Toxicología Alimentaria*, Ediciones Díaz de Santos.

Liu G., Cai Y., O'Driscoll N, 2012, *Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury*, John Wiley & Sons, Inc., Publication.

Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. "Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología". Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 11

Coproporfirinas

Investigación de Coproporfirinas en Orina (Semi-cuantitativa)

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnica semicuantitativa para la determinación de plomo investigando coproporfirinas en orina.
- Adquirir destreza en la ejecución de la técnica.
- Utilizar este método para orientar la investigación en caso de intoxicación por metales, entre ellos Pb, y también en caso de enfermedad metabólicas como las porfirias.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

El sector de la metalurgia es importante en cuanto a exposición a plomo, así como las fábricas de baterías y acumuladores, fundiciones, cablerías e industria del automóvil, industrias de vidrio, cerámica y arcilla. También son importantes las fábricas de perdigones y recuperación plomo desde chatarra.

Hoy en día las intoxicaciones por plomo son en su mayoría de origen profesional. La intoxicación por plomo tiene un evidente interés por las siguientes razones:

- El plomo es el primer agente reconocido como responsable de enfermedad profesional de origen tóxico.
- Es un importante contaminante ambiental, capaz de ingresar al aire, agua y cadena alimentaria por diversos mecanismos, afectando finalmente al ser humano.
- Se manejan anualmente alrededor de 4 millones de toneladas de plomo en el mundo. Este metal es completamente reciclable y no existe un proceso natural de biodegradación, lo que incrementa su peligrosidad ambiental.
- La contaminación ambiental por plomo proviene principalmente de fuentes industriales (como fundiciones, reciclado de baterías y metalurgia), así como de pinturas antiguas, tuberías con plomo y suelos contaminados por el uso pasado de combustibles con plomo en vehículos.

El plomo metálico, sólo es tóxico cuando se funde a temperaturas próximas a los 500 °C. Los vapores que emite son tóxicos y si penetran las vías respiratorias alcanzan fácilmente los alvéolos. Los derivados inorgánicos del plomo constituyen un grupo muy numeroso y por lo general son poco solubles de lo que se deriva una toxicidad relativamente escasa. Los derivados orgánicos de plomo son muy empleados en la industria y se destacan:

- **Acetato de plomo** o (sal de Saturno): es muy soluble y es el único que produce intoxicaciones agudas por vía digestiva.
- **Tetraetilo de plomo**: antidetonante que se ha venido adicionando a la gasolina para aumentar su capacidad de combustión, elevando así su rendimiento. Por razones ecológicas hoy en día está muy generalizado el uso de la gasolina “sin plomo”, que no tienen plomo o lo contienen en muy bajas concentraciones.
- **Estearato de plomo**: se usa para dar estabilidad y consistencia al plástico.
- **Naftaleno de plomo**: es un componente de numerosas grasas y aceites de uso industrial.

La intoxicación por plomo es una de las enfermedades profesionales de índole tóxica más extendida en las naciones industrializadas.

Existen también otras formas de intoxicación por plomo, no necesariamente relacionadas con el ámbito laboral:

- **De origen hídrico**: El agua de bebida se contamina con plomo por tuberías de plomo, o vasijas de barro esmaltadas o pintadas con compuestos de plomo, etc.
- **De origen alimenticio**: consumo de bebidas ácidas envasadas en latas y cerradas con soldaduras que contienen plomo; vinos almacenados en vasijas de barro; harinas contaminadas por insecticidas que contienen plomo o por las ruedas del molino cuando han sido pintadas con plomo. Productos escabechados procedentes de carnes de animales cazados con armas de fuego con perdigones de plomo.
- **Infantiles**: se deben a juguetes fabricados con plomo o pintados con compuestos de plomo.

El plomo puede ingresar al organismo a través de tres vías principales: respiratoria, digestiva y cutánea. La vía respiratoria es la más relevante en el ámbito laboral, ya que por ella se inhalan humos, vapores y polvos que contienen plomo. La vía digestiva es más común en intoxicaciones no ocupacionales. La vía cutánea, por su parte, solo permite la absorción de compuestos orgánicos de plomo, que son altamente liposolubles.

Una vez absorbido, el plomo pasa a la sangre, donde el 90 % se une a los hemáties. Posteriormente, se distribuye en distintos compartimentos del organismo:

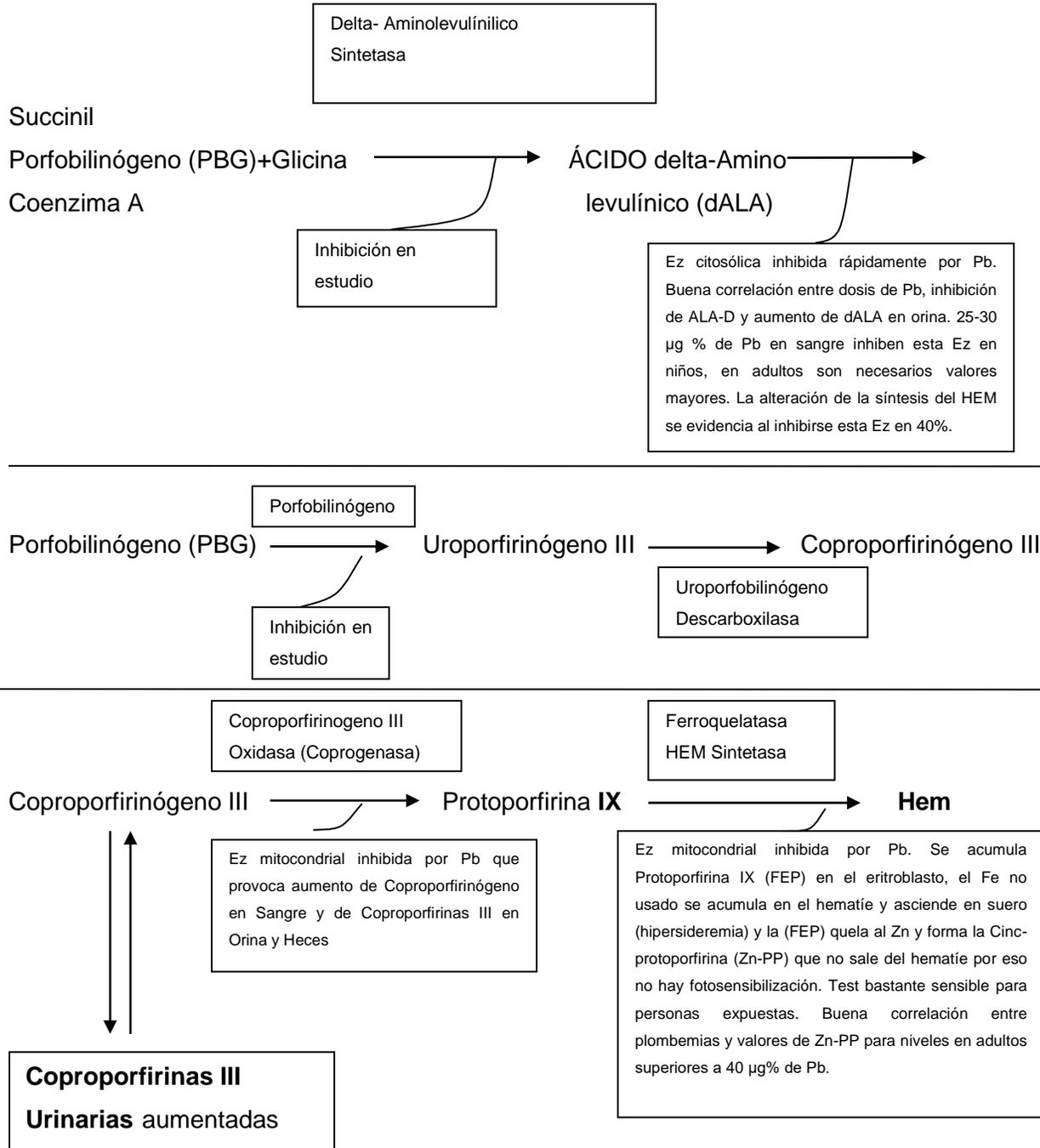
1. Primer compartimento: sangre.
2. Segundo compartimento: hígado y riñones.
3. Tercer compartimento: tejido óseo, donde el plomo se comporta de manera similar al calcio en cuanto a su depósito y movilización.

El plomo se excreta principalmente por la orina, y en menor proporción por las heces, el sudor, la saliva y las faneras (cabello y uñas).

Este metal inhibe numerosas enzimas, especialmente aquellas que contienen grupos sulfhidrilo. Se fija en la médula ósea en concentraciones mucho mayores a las presentes en sangre, donde inhibe enzimas clave del eritroblasto involucradas en la síntesis del grupo hemo, como puede observarse en el siguiente esquema:

Biosíntesis del Grupo Hem

Efectos del Plomo Sobre la Actividad de Distintas Enzimas



Estos efectos del Pb sobre los hematíes provocan la clásica anemia saturnina. Es una anemia moderada, normo o hiperocrómica, que aparece cuando el sujeto se expone a niveles altos de plomo en sangre, superiores a 30 µg %. En sangre periférica se encuentran glóbulos rojos con anomalías y un aumento de reticulocitos o células con punteado basófilo. También en punciones de médula espinal se pueden encontrar megaloblastos y eritroblastos con punteado basófilo.

No existe duda alguna de que, en el curso de intoxicaciones agudas con altas concentraciones de plomo en sangre se produce una clara encefalopatía. Se ha postulado que el SNC del niño es más sensible al plomo que el del adulto, lo que se debe a la mayor facilidad con que el plomo atraviesa la barrera hematoencefálica

El plomo afecta también al sistema nervioso periférico con producción de una neuropatía de predominio motor. Esta es más frecuente en adultos que en niños, y en el varón que, en la mujer, donde afecta los miembros superiores.

Las intoxicaciones de plomo pueden ser de dos tipos, agudas o crónicas. Las agudas pueden provocarse al ingerir una sal soluble de plomo, se caracteriza por tres síndromes: uno digestivo, con dolores abdominales violentos, estreñimiento, diarrea; otro hepatorrenal, con ictericia, uremia, oliguria; y por último una encefalopatía, con edema cerebral, coma y muerte. Las intoxicaciones crónicas o saturnismo son importantes en ambientes laborales, donde el primer estadio es importante a fin de alejar al individuo de la fuente de intoxicación. La fase de presaturnismo se caracteriza por cansancio, dispepsia, dolores abdominales y musculares, artralgias, insomnio y alteraciones del carácter. Pérdida de fuerza y adelgazamiento. En la exploración se puede apreciar un tinte terroso de la piel. En algunos casos podría verse el ribete gingival de Burton, es una línea azulada que aparece en el reborde gingival, donde hay dientes. Se debe al depósito del sulfuro de plomo en ese lugar. Sólo aparece en ausencia de higiene bucodental y es el producto de plomo unido al sulfhídrico producido por la actividad bacteriana.

En la fase de saturnismo se acrecientan los síntomas ya señalados en la fase de pre-saturnismo: anorexia, adelgazamiento, dolores musculares, tinte terroso de la piel y cansancio. Anemia progresiva. Va precedida de un período en el que los hematíes con granulaciones basófilas van aumentando de forma progresiva. La anemia es moderada, raramente inferior a 3 millones de glóbulos rojos, normo o hipocrómica. Se puede incluir dentro de las anemias sideroblásticas, dados la presencia de sideroblastos con el aumento del hierro sérico. Pueden aparecer anomalías en los glóbulos rojos. La hemoglobina desciende. La polineuritis es una de las lesiones clásicas del saturnismo. Hoy es poco frecuente; suele aparecer de modo

progresivo, pero también se puede presentar de modo brusco. Suele afectar a los músculos más activos de los miembros superiores, los extensores de los dedos medio y anular de las manos, produciendo la mano en “cuernos” y si prosigue la mano péndula para luego afectar los miembros inferiores.

El tratamiento de la intoxicación por plomo es la quelación.

Fundamento del Método

Las porfirinas, con sus grupos carboxilos libres, son llevadas a su punto isoeléctrico para ser extraídas con solvente orgánico. Posteriormente son extraídas de este último con ácido clorhídrico 1,5 N. Por último, se detectan por su fluorescencia a la luz U.V. o por su espectro de absorción.

Materiales y Métodos

Reactivos:

1. Ácido acético al 5 %.
2. Agua oxigenada al 3 % de preparación reciente.
3. Éter etílico.
4. Metanol.
5. Ácido clorhídrico 1,5 N.
6. Hidróxido de sodio al 10 %.
7. Ácido clorhídrico concentrado.
8. Alcohol etílico al 96 %.

Actividades a Desarrollar

1. En ampolla de decantación de 25 mL colocar 5 mL de orina muestra y cantidad de ácido acético hasta pH inferior a 4,1.
2. Adicionar 5 gotas de agua oxigenada al 3 % y 5 mL de éter etílico.
3. Agitar (si se forma emulsión romperla con 1 mL de metanol puro).
4. Desechar la fase acuosa y tratar la fase orgánica con 1 mL de ácido clorhídrico 1,5 N.
5. Separar la fase acuosa clorhídrica y observar a la luz U.V.

Resultados

Orina normal (ensayo negativo): fluorescencia blanco–azulada, blanco amarillento o azul-verdosa

Orina patológica (ensayo positivo): fluorescencia rosada o roja, que se debe a la excreción aumentada de las coproporfirinas en orina.

Este ensayo da positivo cuando la plumbemia es de 40 $\mu\text{g}\%$. Sin embargo, la experiencia en nuestro laboratorio ha demostrado que el ensayo da positivo con plumbemias de 60 $\mu\text{g}\%$.

Prueba confirmatoria

- 1.- En un tubo de ensayo colocar 10 mL de muestra y adicionar 3 mL de hidróxido de sodio al 10 %.
- 2.- Filtrar y lavar con agua destilada el precipitado.
- 3.- Agregar sobre el papel de filtro 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y lavar con 2 mL de alcohol etílico al 96 %, gota a gota sobre los bordes del papel. Recoger en tubo de hemólisis.
- 4.- Observar a la luz U.V. y luego en espectroscopio las bandas de absorción de la hematoporfirina ácida.

Referencias

Gisbert Calabuig, J. A. 2004. *"Medicina Legal y Toxicología"*. Masson-Salvat medicina.

Fiorenza Biancucci G., González D., Pérez A., Ridolfi A., Strobl A., 2008. *"Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos para Laboratorios de Baja Complejidad"*. Publicado por Asociación Toxicológica Argentina ISBN: 978-987-24163-0-0 Bs. As. Argentina.

Cameán A. M., Repetto M., 2006, *Toxicología Alimentaria*, Ediciones Díaz de Santos.

Código Alimentario Argentino.

Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. *"Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología"*. Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 12

Barbitúricos

Determinación Cualitativa de Barbitúricos en Sangre y Orina

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas cualitativa para la detección de barbitúricos.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas de extracción e identificación cromatográfica.
- Determinar barbitúricos en muestras de interés toxicológico, forense y legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

Los barbitúricos son una familia de fármacos derivados del ácido barbitúrico que actúan como sedantes del sistema nervioso central y producen un amplio esquema de efectos, desde sedación suave hasta anestesia total. También son efectivos como ansiolíticos, como hipnóticos y como anticonvulsivos. Poseen efectos negativos como: un alto potencial de adicción, tanto física como psicológica; elevada toxicidad en sobredosis; aceleración del metabolismo de otros fármacos por activación del sistema microsomal hepático; y rápido desarrollo de tolerancia. Los barbitúricos han sido reemplazados por las benzodiazepinas en la práctica médica de rutina, por ejemplo, en el tratamiento de la ansiedad y el insomnio, principalmente porque las benzodiazepinas son mucho menos peligrosas en sobredosis, aunque también generan adicción. Actualmente y por los efectos negativos mencionados, los barbitúricos sólo se emplean en la terapéutica antiepiléptica y anestesia quirúrgica.

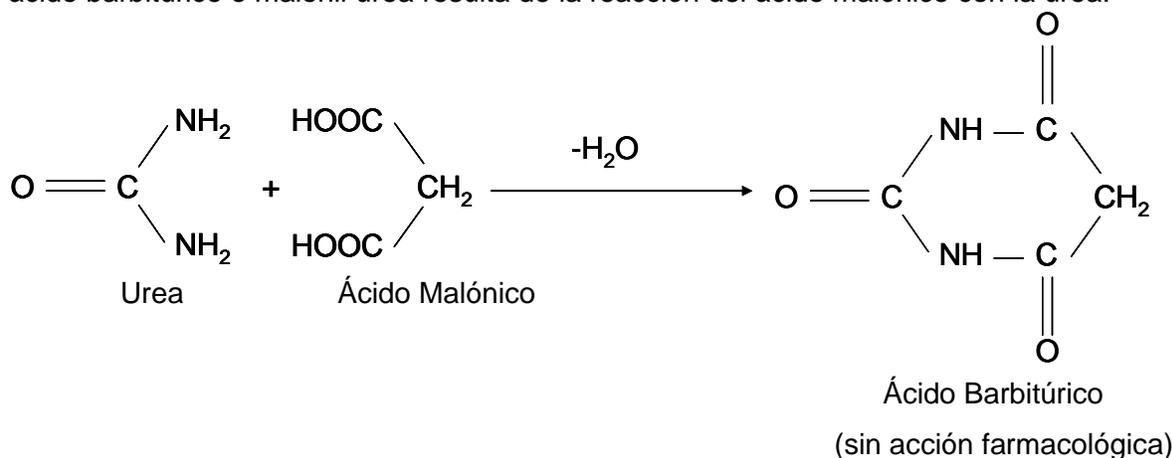
Se unen a los receptores del GABA, neurotransmisor inhibitorio, aumentando la acción de este neurotransmisor.

La sintomatología de las intoxicaciones por barbitúricos cursa 3 periodos:

- Periodo precomatoso: semejante a un estado de embriaguez.
- Periodo comatoso: cursa con un coma profundo, bradipnea, ritmo anormal respiratorio, hipertermia.
- Periodo terminal: se producen alteraciones circulatorias ocasionando un colapso sistémico.

El tratamiento de la intoxicación consiste en la eliminación del fármaco del organismo por lavado gástrico, diuresis forzada, hemodiálisis.

El ácido barbitúrico o malonil urea resulta de la reacción del ácido malónico con la urea.

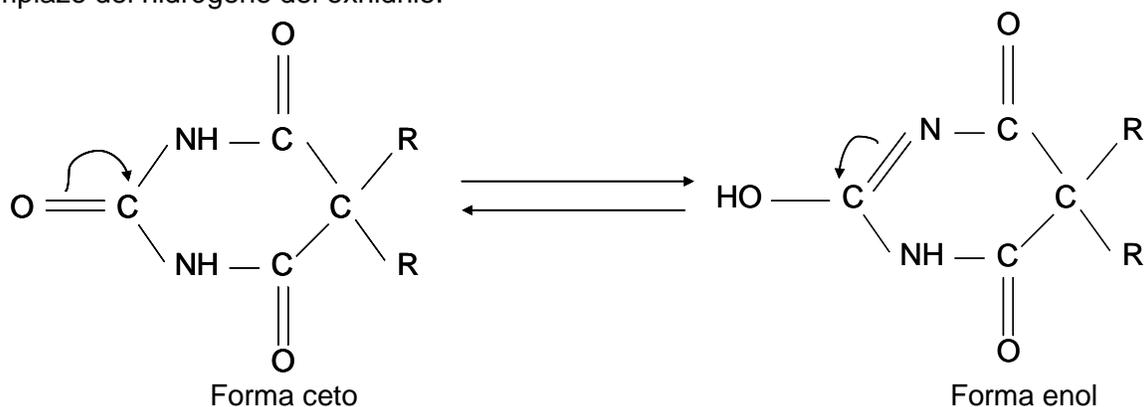


Los barbitúricos se detoxifican a nivel hepático, transformándose en compuestos menos activos. La detoxificación se produce por oxidación de cadenas laterales y por apertura del anillo de malonil-urea con formación de ácidos ureinocarbónicos. Estos metabolitos se eliminan por orina.

Fundamento de la Técnica

Los derivados del ácido barbitúrico son solubles en medio ácido en solventes orgánicos. La técnica aprovecha esta propiedad para extraerlos desde sangre u orina. Posteriormente se realizan reacciones de caracterización y cromatografía en capa delgada, revelándose como manchas blancas sobre fondo blanco con sulfato de mercurio y luego rosadas sobre fondo violeta con difenilcarbazona.

La forma enol es la responsable de la formación de complejos coloreados, por facilitar el reemplazo del hidrógeno del oxhidrilo.



Materiales y Métodos

Muestras: Sangre entera y orina.

Reactivos:

1. Ácido sulfúrico 1N.
2. Cloroformo.
3. Metanol.
4. Acetato de cobalto al 10 %.
5. Amoníaco al 10 %.
6. Cianuro de potasio al 10 %.
7. Sulfato de mercurio: Tomar 1 g de sulfato de mercurio y adicionar 20 mL de agua; añadir 4 mL de ácido sulfúrico lentamente y agitando. Diluir a 50 mL con agua destilada. Conservar en heladera en frasco oscuro.
8. Difenilcarbazona: Diluir 25 mg de difenilcarbazona en 250 mL de cloroformo. Conservar en heladera en frasco oscuro.

Actividades a Desarrollar

Para orina

1. Colocar 10 mL (50 mL) de orina muestra en una ampolla de decantación, adicionar 1 mL (4 mL) de ácido sulfúrico 1N y 5 mL (20 mL) de cloroformo.
2. Separar por decantación y extraer.
3. Repartir la extracción de la fase clorofórmica en 3 vidrios de reloj (en 3 cápsulas de porcelana).
4. Repetir extracción adicionando 5 mL de cloroformo, y repartir en 2 vidrios de reloj. (Repetir extracción adicionando 20 mL de cloroformo, y repartir en 3 cápsulas de porcelana).
5. En el 1° vidrio de reloj realizar la **Reacción de Parri**: Evaporar y adicionar 0,5 mL de metanol, 1 gota de acetato de cobalto al 10 % y 1 gota de amoníaco (Positivo: color violeta).

Observar coloración

6. En el 2° vidrio de reloj realizar la **Reacción de Paget - Desodt**: Evaporar y agregar 2 mL de acetato de cobalto al 10 %, 1 gota de cianuro de potasio al 10 % y una gota de amoníaco al 10 % (Positivo: color rojo/violáceo).

Observar coloración

7. En el 3° vidrio de reloj retomar con metanol y sembrar placa cromatográfica. Los solventes de corrida y los reveladores están descriptos a continuación para muestra de sangre.

Para sangre entera

1. Colocar 5 mL de sangre entera muestra en ampolla de decantación, acidificar y extraer con 25 mL de cloroformo.
2. Separar la fase clorofórmica en vidrio de reloj y evaporar en baño maría a 45° C.
3. Retomar con metanol y sembrar en placa cromatográfica.

Solventes: Cloroformo - metanol - agua (8,6 / 1,8 / 0,1) (43 / 9 / 0,5)

Reveladores: a) Sulfato de mercurio, observar coloración

b) Difenilcarbazona, observar cambio de color

Resultado positivo: manchas blancas, sobre fondo blanco. El fondo torna violeta al agregar la difenilcarbazona.

Referencias

Goodman Gilman A., Brunton L. L., Chabner A. C., Knollmann B. C., 2011, Goodman & Gilman *las bases farmacológicas de la terapéutica*, Mc Graw Hill.

Lorenzo Fernández P., Ladero Quesada J. M., Leza Cerro J. C., Lizasoain Hernández I., 2009, *Drogodependencias: farmacología, patología, psicología, legislación*, Editorial Médica Panamericana.

Gisbert Calabuig, J. A. 2004. "*Medicina Legal y Toxicología*". Masson-Salvat medicina.

Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. "*Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología*". Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 13

Marihuana

Determinación de Marihuana

objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas de extracción e identificación cualitativa, para marihuana y sus compuestos.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas de observación microscópica, extracción e identificación cromatográfica.
- Determinar marihuana, y sus compuestos, en muestras de interés toxicológico y legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

La marihuana pertenece a la familia *Cannabaceae*, que se encuentra compuesta por los géneros *Cannabis* y *Humulus*; y las principales especies con actividad psicoactiva y narcótica son *C. indica* y *C. sativa*. En el año 4000 a. C., se empezaron a describir algunos usos medicinales como analgésico, antiepiléptico, hipnótico, ansiolítico y antiinflamatorio, los cuales vuelven a ser investigados y aplicados actualmente.

La planta del cannabis contiene al menos 60 cannabinoides distintos entre los 400 compuestos químicos identificados. Entre ellos se encuentran el Δ^9 -tetra-hidro-cannabinol (THC), cannabinol (CBN) y cannabidiol (CBD) que poseen psicoactividad.

Hay diferentes maneras en las que se puede producir cannabis:

- MARIHUANA, con un contenido de THC del 0,5 al 5 %, se prepara a partir de las flores, hojas y tallos de pequeño tamaño desecados y triturados. La misma es ingerida o fumada en cigarrillos enrollados fuertemente, llamados comúnmente porros, o en pipas de brazo pequeño.
- HASHISH (hachís), consiste en un preparado de resina exudada y flores prensadas. El hachís puede contener del 2 al 20 % de THC.
- ACEITE DE HASHISH, La resina o aceite de cannabis, puede llegar a contener del 15 % al 50 % de THC, se recoge de la secreción de las brácteas y de las terminaciones de los tallos, y se mezcla la resina con algún disolvente (acetona, alcohol o gasolina). Se consume aplicando una línea (de 3 a 4 gotas) a lo largo de un cigarrillo, lo que permite identificarlo al visualizarse una línea de grasa.
- KIF: es la palabra marroquí para marihuana. Es un producto limpio del cannabis donde se han removido la mayor parte de las semillas y tallos.

Los cannabinoides funcionan como neurotransmisores inhibitorios, y actúan sobre dos receptores cerebrales específicos (CB1 y CB2), que están ampliamente distribuidos en varias regiones cerebrales. Estos receptores se activan mediante un ligando endógeno, llamado anandamida. Este es el cannabinoide natural del cerebro, que funciona como un neurotransmisor y que tiene menor potencia y menor duración que el THC.

Cuando la absorción se produce por inhalación entre un 10 % y un 25 % llega a la sangre; vía oral (aceites, pasteles, infusiones) la absorción es lenta y errática. Su biodisponibilidad puede variar entre un 5 % y un 10 % debido a que es destruido parcialmente por el jugo gástrico y a que es sometido a intensa metabolización hepática de primer paso.

La distribución del THC se produce por circulación unido preferentemente a lipoproteínas (LDL). Una parte del THC que se une a proteínas se encuentra acoplado a las células sanguíneas. Sólo el 3 % del THC circula libre en el plasma, una proporción penetra en el sistema nervioso central, traspasando la barrera hemato-encefálica.

El metabolismo consiste en una primera transformación a nivel pulmonar y hepático en 11-hidroxi-THC (11-OH-THC), atravesando este más fácilmente la barrera hemato-encefálica. Después de una segunda metabolización hepática el 11-OH-THC se convierte en varios metabolitos inactivos como el 11-nor-carboxi- Δ^9 -THC (THC-COOH), que es el metabolito más abundante en plasma y en orina.

La excreción de metabolitos del THC es lenta, hasta 30 días post consumo. Se excretan principalmente por la bilis y las heces (65-70 %); el resto se elimina por la orina como ácido carboxílico 11-nor-THC-9 o THCCOOH que es el principal metabolito. Este es detectable desde 1 hora luego consumo hasta 2-5 días en usuarios infrecuentes y 6-8 semanas en usuarios crónicos.

La marihuana a bajas dosis produce sensaciones de bienestar y tranquilidad, alteraciones de la percepción temporal y sensorial, alteración de las habilidades cognitivas, trastorno de la memoria a corto plazo, sequedad bucal, taquicardia, hambre, midriasis, inyección conjuntival (ojos rojos). A dosis elevadas aumentan sus efectos nocivos dando un estado de confusión mental, gran somnolencia, alucinaciones, paranoia. Las complicaciones de su consumo a largo plazo involucran bronquitis, faringitis, infertilidad masculina problemas de memoria de corto y largo plazo, retención de orina, trastornos psiquiátricos (ataques de ansiedad o de pánico). El THC atraviesa la barrera placentaria, por lo que su consumo supone un riesgo importante en el embarazo y la lactancia. También se produce tolerancia, y el síndrome de abstinencia conduce a anorexia, ansiedad, insomnio, irritabilidad y depresión.

Fundamento de la Técnica

Los cannabinoides son extraídos con éter de petróleo y posteriormente caracterizados a través de cromatografía en placa fina y reacciones de color. Además, se realizará observación microscópica de elementos morfológicos característicos.

Materiales y Métodos

Reactivos:

1. Éter de petróleo.
2. Cloroformo.
3. Benceno.
4. Nitrito de sodio al 10 %.
5. Diazoico de la bencidina: tomar 0,5 g de bencidina y adicionar 1,4 mL de ácido clorhídrico puro, llevar a 100 mL con agua destilada. En el momento de usar mezclar con un volumen igual de nitrito de sodio al 10 %.
6. Glicerina.
7. Paradimetilaminobenzaldehído en medio sulfúrico: Tomar 65 mg de P-dimetilaminobenzaldehído y adicionar 5 mL de ácido sulfúrico más 1 mL de agua destilada. Preparar en el momento de usar.

Actividades a Desarrollar

1. En un tubo de ensayo colocar unos mg del producto sospechoso más 3 mL de éter de petróleo.
2. Agitar y dejar en reposo 5 minutos.
3. Repartir el extracto etéreo en una cápsula de porcelana (en dos cápsulas de porcelana A y B).
4. Evaporar a sequedad el contenido de las mismas.
5. En A practicar el **Test de Ghanrawy**:

Al residuo seco adicionar 0,5 mL de paradimetilaminobenzaldehído en medio sulfúrico.

Observar coloración:.....

Luego enfriar y agregar 1 mL de agua destilada.

Observar cambio de color:

Resultado: positivo color rojo, que vira al azul al agregar agua destilada.

6. En B retomar el residuo seco con 3 gotas de cloroformo y sembrar en placa cromatográfica.

Solventes: benceno – cloroformo (7: 3)

Revelador: diazoico de la bencidina, que se prepara en el momento de usar mezclando iguales volúmenes (2 mL y 2 mL) de bencidina ácida y nitrito de sodio al 10 %.

Observar coloración

Resultado: positivo color rojo-naranja y amarillos.

Observación microscópica

El material sospechoso, (picadura de marihuana) se pulveriza a grueso y se agregan unas gotas de glicerina. Luego se coloca una pequeña parte en un portaobjetos y se observa al microscopio.

Describir y/ o dibujar la observación.

Referencias

Lorenzo Fernández P., Ladero Quesada J. M., Leza Cerro J. C., Lizasoain Hernández I., 2009, *Drogodependencias: farmacología, patología, psicología, legislación*, Editorial Médica Panamericana.

Gisbert Calabuig, J. A. 2004. "*Medicina Legal y Toxicología*". Masson-Salvat Medicina.

Pertwee R. G., 2014, *Handbook of Cannabis*, Oxford University Press.

Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. "*Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología*". Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 14

Alcaloides

Separación e Identificación de Alcaloides y Bases Relacionadas

Técnica de Nickolls - Daubney

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas cualitativa para la detección de alcaloides.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas de extracción e identificación cromatográfica.
- Determinar alcaloides en muestras de interés toxicológico, forense y legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

Los alcaloides son sustancias extraídas de las plantas. La mayoría de ellos son insolubles en agua, y solubles en solventes orgánicos. La intoxicación por parte de estas sustancias es poco frecuente debido a que son difíciles de obtener y sus propiedades tóxicas son bien conocidas.

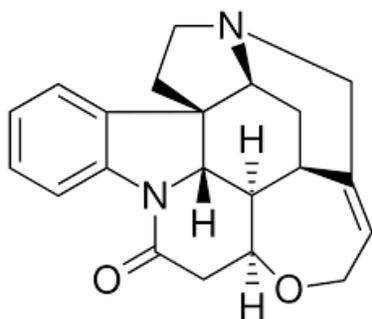
Una sustancia representativa de estos es la estricnina, la cual se obtiene de la *Strychnos nux-vomica*, o nuez vómica, planta exótica de Asia tropical. Presenta un sabor amargo característico, lo que dificulta su empleo de forma criminal, sin embargo, en nuestro laboratorio se halló estricnina en muestras de vino y yogur destinado a una pareja de abuelos. Se solía emplear en preparados de cebos contra plagas, aunque su uso en la actualidad ha desaparecido. Es un tóxico selectivo del sistema nervioso central, actúa antagonizando competitivamente la glicina, neurotransmisor inhibitorio central. El resultado del bloqueo de la glicina en las neuronas motoras es una hiperexcitación de los grupos musculares por la pérdida de la inhibición normal. Los síntomas se caracterizan por una aparición brusca de un ataque convulsivo, tétanos estricnínico, caracterizado por una contracción tónica enérgica. Estos ataques se producen a intervalos variables, y con estímulos insignificantes como ruidos, roces, luces, etc. Se producen síntomas de asfixia como consecuencia de estos espasmos en los músculos respiratorios, lo que conduce a la muerte. La dosis tóxica es de 0,05 g. Como tratamiento no se aconseja evacuantes, sólo neutralizantes como el líquido de Lugol, y sintomáticos como el propranolol (β bloqueante).

La atropina es otro alcaloide, se obtiene de plantas de belladona, estramonio y mandrágora. Se caracteriza desde el punto de vista fisiológico por su propiedad paralizante del

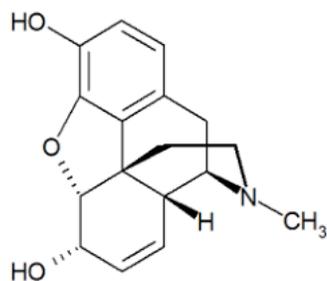
sistema nervioso autónomo parasimpático. Las intoxicaciones son principalmente de tipo accidental asociado al uso medicamentoso de atropina. Los síntomas que produce son taquicardia, enlentecimiento y parálisis del peristaltismo intestinal, inhibición de las secreciones salivales, digestivas, bronquiales y sudorales, vasodilatación y dilatación pupilar. El tratamiento consiste en la administración de un antagonista, la fisostigmina, con capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, y actuar a nivel central.

Otras sustancias características dentro de los alcaloides son el opio y la morfina. El opio es el jugo desecado de la adormidera, *Papaver somniferum*. El opio contiene unos 20 alcaloides, dentro de los cuales la morfina es el más abundante y el más tóxico. Las intoxicaciones por morfina son suicidas, sobretodo en profesiones sanitarias; y en toxicómanos por sobredosis. Para opio y morfina las dosis mortales son de 2–4 g y 0,015–20 g respectivamente. La morfina es un tóxico nervioso central, ejerciendo una acción depresora sobre neuronas morfino-sensibles con receptores opiáceos. La intoxicación por morfina presenta dos periodos bien distintos, uno de excitación, muy parecido al ocasionado por etanol, seguido por uno de depresión que conduce al coma y a la muerte. El tratamiento es evacuante-neutralizante, y antidótico a través de *N*-alilmorfina y naloxona.

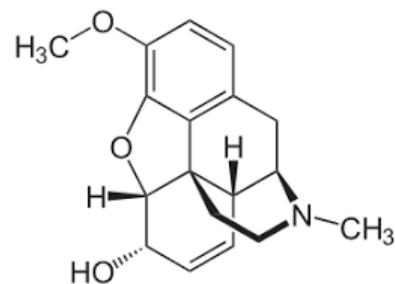
Fórmulas de Alcaloides



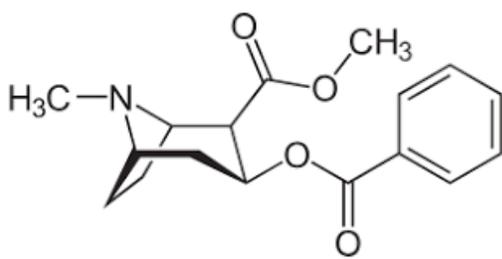
Estricnina



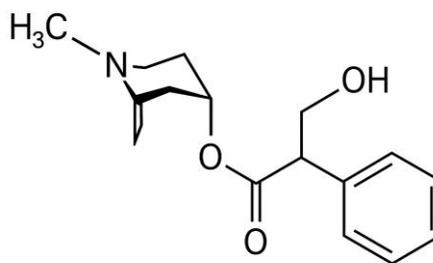
Morfina



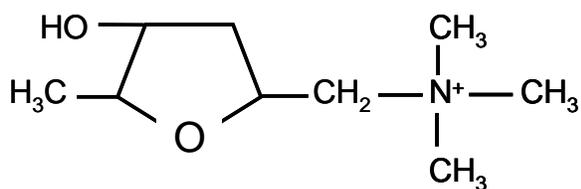
Codeína



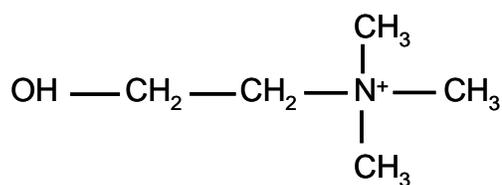
Cocaína



Atropina



Muscarina



Colina

Figura 6. Formulación de la familia de alcaloides.

Fundamento de la Técnica

Los Alcaloides son solubles en agua, en medio ácido y solubles en solventes orgánicos en medio alcalino. Aprovechando estas propiedades se realiza la separación desde material biológico y posteriormente se hacen reacciones de caracterización.

Materiales y Métodos

Muestras: tejido macerado, contenido estomacal, orina, sangre, residuos en la escena, formulaciones comerciales. Para orina y sangre se realiza una desproteización con ácido tricloroacético. Para tejido, dividirlo finamente y hacer una suspensión en agua. Desproteizar con sulfato de amonio en medio ácido acético glacial. En las formulaciones comerciales se puede aplicar estas determinaciones directamente en el producto.

Reactivos:

1. Ácido acético glacial.
2. Sulfato de amonio.
3. Amoníaco.
4. Cloroformo.
5. Ácido sulfúrico 3N.
6. Ácido clorhídrico 1/10.
7. Ácido sulfúrico concentrado.
8. Reactivo de Buchardat: tomar 1 g de Iodo más 2 g de ioduro de potasio y llevar a 100 mL con agua destilada.
9. Reactivo de Mayer: tomar 1,355 g de Cloruro de Mercurio (II) más 4,98 g de ioduro de potasio y llevar a 100 mL de agua destilada.
10. Reactivo de Mandelin: 0,5 a 1 % de vanadato de amonio en ácido sulfúrico concentrado.
11. Reactivo de Marchand - Otto: dicromato de potasio.

Actividades a Desarrollar

Para Tejido Macerado

a) Desproteización y Separación

- 1- Adicionar al macerado de tejido 4 mL de ácido acético glacial; agitar y calentar durante 10 minutos a 50 °C.
- 2- Agregar sulfato de amonio hasta saturación y calentar durante 10 minutos a 65 °C.
- 3- Filtrar y lavar con agua tibia y agua acidulada con ácido acético.
- 4- Alcalinizar con amoníaco, llevar a ampolla de decantación y adicionar 20 mL de cloroformo. Agitar y separar la fase clorofórmica. Repetir la operación de extracción con cloroformo dos veces.
- 5- Reunir los extractos clorofórmicos y extraer con 10 mL de ácido sulfúrico 3N. Realizar esta operación de extracción dos veces.

6- Desechar la fase clorofórmica, alcalinizar la fase acuosa ácida con amoníaco y agregar 20 mL de cloroformo. Agitar y separar la fase clorofórmica. Repetir esta operación de extracción con cloroformo dos veces.

7- Reunir las fases clorofórmicas y repartir en cuatro vidrios de reloj, evaporar en baño maría y realizar las reacciones de caracterización detalladas a continuación.

b) Reacciones de Caracterización

Reacciones generales para Alcaloides:

1- Reacción de Buchardat: retomar el extracto seco con 1 mL de ácido clorhídrico 1/10 y adicionar 2 gotas de reactivo de Buchardat (positivo: precipitado marrón-castaño).

Observar coloración

2- Reacción de Mayer: retomar el extracto seco con 1 mL de ácido clorhídrico 1/10 y adicionar 2 gotas de reactivo de Mayer (positivo: precipitado blanco, observar sobre un fondo oscuro).

Observar coloración

Reacciones Específicas Para Estricnina:

3- Reacción de Marchand-Otto: retomar el extracto seco con 4 o 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado y adicionar unos cristales de dicromato de potasio en los bordes del vidrio, sin que estos tomen contacto con sulfúrico. Posteriormente con una varilla de vidrio arrastrar los cristales de dicromato, sobre el residuo, haciéndolos tomar contacto con el sulfúrico (positivo: color violeta).

Observar coloración del rayado

4- Reacción de Mandelin: adicionar al extracto seco una gota de reactivo de Mandelin (positivo: color violeta que luego va cambiando a rojo-cereza).

Observar coloración

Referencias

Lorenzo Fernández P., Ladero Quesada J. M., Leza Cerro J. C., Lizasoain Hernández I., 2009, Drogodependencias: farmacología, patología, psicología, legislación, Editorial Médica Panamericana.

Goodman Gilman A., Brunton L. L., Chabner A. C., Knollmann B. C., 2011, Goodman & Gilman las bases farmacológicas de la terapéutica, Mc Graw Hill.

Gisbert Calabuig, J. A. 2004. "Medicina Legal y Toxicología". Masson-Salvat Medicina.

Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. "Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología". Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 15

Cocaína

A) Investigación de Cocaína en Bebidas Analcohólicas

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas cualitativa para la detección de cocaína.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas de extracción e identificación cromatográfica.
- Determinar cocaína en muestras de interés toxicológico y legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

La cocaína se extrae de las hojas de la coca o *Erythroyilum coca*, el cual se cultiva en ciertas regiones de Sudamérica. Las dosis mortales se encuentran entre 0,5 – 1 g. A nivel del sistema nervioso central, actúa específicamente como un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina, aumentando el efecto de estos neurotransmisores, causando diferentes acciones a nivel sistémico. En la mayoría de los países la cocaína es una popular droga recreacional prohibida. La intoxicación aguda por cocaína da lugar a un cuadro complejo con síntomas psíquicos, neurológicos, circulatorios y respiratorios. Entre los síntomas psíquicos se destacan la excitación psíquica y motriz, llantos y risas con pseudopercepciones alucinógenas. Midriasis, anestias y parestias, y convulsiones, epilepsia cocaínica, se encuentran dentro de los síntomas neurológicos. Dentro de los trastornos circulatorios se puede mencionar un marcado efecto vasoconstrictor con palidez extrema. Los trastornos respiratorios ocasionados por la intoxicación cocaínica son bradipnea, seguida de disnea y polipnea. El tratamiento es evacuante-neutralizante. Dentro de este último se puede mencionar el propranolol (β bloqueante) y diazepam y luminal (anticonvulsivantes).

En nuestro país, el tráfico de estupefacientes se halla penado por la Ley Nacional 23737 y Artículo 204 del código penal. Una de las formas de consumo más frecuente de cocaína es el “paco”, que es una droga callejera de bajo costo elaborada a partir de bicarbonato de sodio, cafeína, cocaína, anfetaminas entre otras sustancias. Cada dosis pesa sólo entre 0,01 y 0,03 gramos. Según el gobierno de la Provincia de Buenos Aires, el consumo intenso de *paco* puede producir muerte cerebral en al menos 6 meses. El adicto al paco puede fumar por día, en promedio, 10 a 15 cigarrillos. Por semana, mueren dos jóvenes a causa del paco (2007).

La cocaína en forma de clorhidrato suele circular en el comercio ilícito, adulterada por drogas de similar aspecto físico (ácido bórico cristalizado) y/o dotadas de cualidades idénticas (novocaína anestésica, xilocaína, etc), así como también pueden agregarse polvos inertes (lactosa, bicarbonato de sodio, etc) y se consume inhalada o “esnifada”.

Fundamento de la Técnica

Cocaína posee la propiedad de ser soluble en agua en medio ácido y soluble en solventes orgánicos (Cloroformo) en medio alcalino. Aprovechando esta característica se la extrae y posteriormente se la identifica realizando cromatografía en capa fina.

Cocaína y Metabolitos Detectables

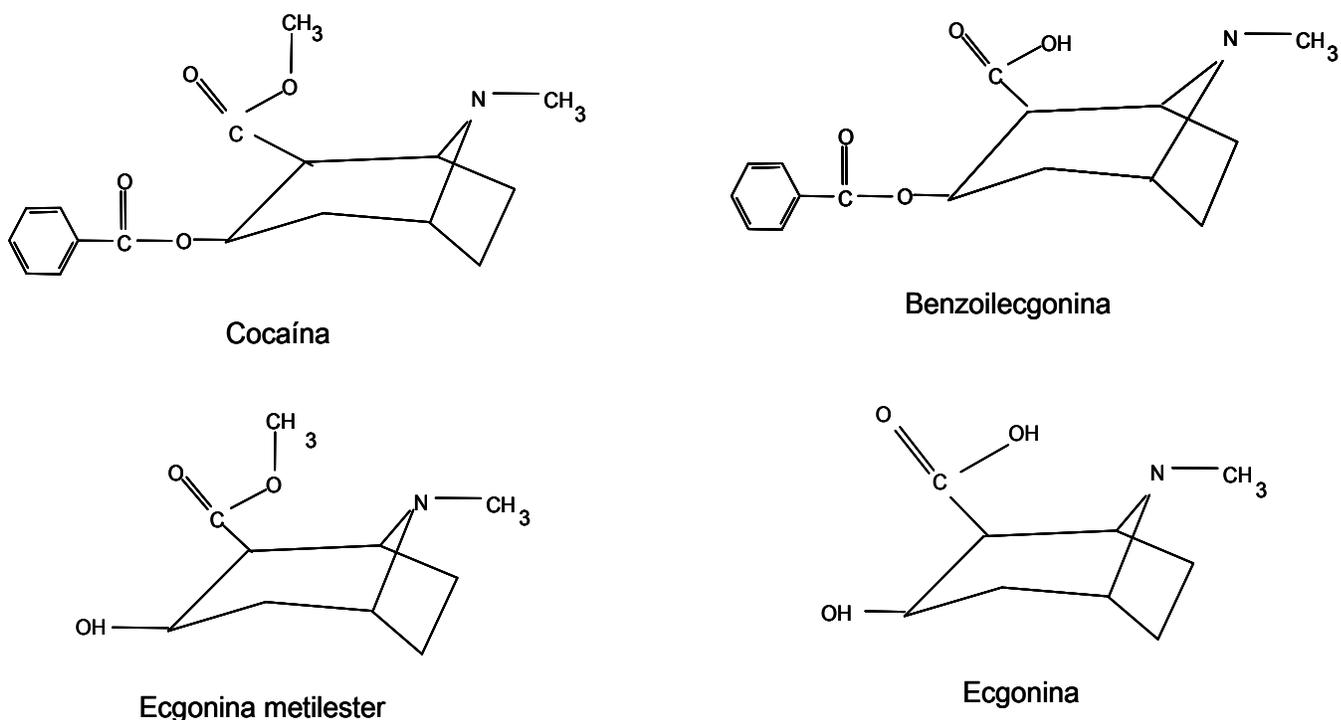


Figura 7. Formulación de cocaína y de los diversos metabolitos de cocaína detectables en orina.

Materiales y Métodos

Reactivos:

1. Ácido clorhídrico concentrado.
2. Cloroformo.
3. Amoníaco.
4. Ácido clorhídrico al 1 %.
5. Acetato de etilo.
6. Benceno.

7. Reactivo de Munier – Macheboeuff: Mezclar en el momento de usar: 10 mL de agua destilada, 2 mL de ácido Acético, 1 mL de solución B y 1 mL de solución A (2 mL de solución A más 2 mL de solución B; luego 4 mL de ácido acético y 20 mL de agua destilada).

Solución A: Pesar 2 g de Subnitrato de bismuto ($4\text{BiNO}_3(\text{OH})_2\text{BiO}(\text{OH})$) y llevar a solución con 25 mL de ácido acético puro y 100 mL de agua destilada

Solución B: Pesar de Ioduro de potasio 4 g y llevar a 100 mL con agua destilada

Actividades a Desarrollar

1. En una cápsula de porcelana colocar 10 mL de muestra, en el T.P. se utilizará una bebida cola, calentar en baño maría, agitando con varilla de vidrio periódicamente para eliminar el dióxido de carbono y pasar a una ampolla de decantación.
2. Si el pH no es ácido adicionar gotas de ácido clorhídrico hasta acidez.
3. Extraer con 5 mL de cloroformo agitando energicamente; separar y desechar la fase clorofórmica (contiene cafeína, de comportamiento anfótero, en caso de refrescos cola).
4. Alcalinizar con amoníaco.
5. Extraer cocaína básica con 3 mL de cloroformo agitando energicamente; dejar separar las dos fases, decantar y si es necesario filtrar recogiendo en un vidrio de reloj.
6. Incorporar 0,5 mL de ácido clorhídrico al 1 % en volumen y evaporar a sequedad en baño maría hirviente. Al residuo seco adicionarle gotas de agua destilada en baño maría hirviente eliminando todo resto de ácido.
7. Retomar el residuo seco con 0,5 mL de agua destilada y sembrar placa cromatográfica.

Solventes: acetato de etilo - benceno - amoníaco (6 / 3,5 / 0,5) (60 / 35 / 5)

Revelador: reactivo de Munier – Macheboeuff (positivo: manchas color naranja).

Mezclar en el momento de usar: 10 mL de agua destilada, 2 mL de ácido acético, 1 mL de solución B y 1 mL de solución A (2 mL de solución A más 2 mL de solución B; luego 4 mL de ácido acético y 20 mL de agua destilada).

Observar coloración

B) Determinación de Cocaína en Bebidas Analcohólicas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrofotómetro UV- visible es una técnica eficiente que combina el poder de separación HPLC con la sensibilidad y selectividad de la espectrometría UV-visible. Los componentes de la muestra separados en el HPLC pasan al espectrofotómetro UV- visible donde las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez la cantidad de luz absorbida depende de la concentración.

Fundamento de la Técnica

Cocaína posee la propiedad de ser soluble en agua en medio ácido y soluble en solventes orgánicos (cloroformo) en medio alcalino. Aprovechando esta característica se la extrae y posteriormente se la identifica mediante HPLC acoplada a un espectrofotómetro UV-visible.

Reactivos:

1. Ácido clorhídrico concentrado.
2. Cloroformo.
3. Amoníaco.
4. Ácido clorhídrico al 1 %.

Instrumentación:

1. Cromatógrafo Serie 200 Perkin-Elmer (Thornhill, Canadá).
2. Columna C8 PHENOMENEX (4.6 x 150 mm 5-Micro).
3. Espectrofotómetro UV-visible (Modelo UV-1280, SHIMADZU).
4. Celda de flujo continuo.
5. Micropipetas automáticas.

Actividades a Desarrollar

1. Colocar 10 mL de muestra en una ampolla de decantación.
2. Si el pH no es ácido adicionar 300 μ L de ácido clorhídrico 1 % hasta acidez.
3. Extraer con 5 mL de cloroformo agitando energicamente; separar y desechar la fase clorofórmica (contiene cafeína, de comportamiento anfótero, en caso de refrescos cola).
4. Alcalinizar con amoníaco 300 μ L.
5. Extraer cocaína básica con 3 mL de cloroformo agitando energicamente; dejar separar las dos fases, decantar y si es necesario filtrar recogiendo en un vidrio de reloj.

6. Incorporar 0,5 mL de ácido clorhídrico al 1 % en volumen y evaporar a sequedad en baño maría hirviente. Al residuo seco adicionarle gotas de agua destilada en baño maría hirviente eliminando todo resto de ácido.
7. Retomar el residuo seco con 0,5 mL de agua destilada.
8. Inyectar en HPLC.

CONDICIONES EXPERIMENTALE HPLC-UV

Fase estacionaria	Columna fase reversa C8
Fase móvil	ACN-agua-ácido acético (40:58:2)
Caudal	1 mL min ⁻¹
Detección	λ 290 nm
Tiempo	450 sec
Volumen de Inyección	100 µL

Resultados

Para la cuantificación se realiza previamente una curva de calibrado con concentraciones crecientes y conocidas del standard de cocaína, seguidamente se procede a la lectura de la muestra, una vez obtenido el espectro, mediante un programa estadístico se integra el área del pico y se extrapola en la curva de calibrado.

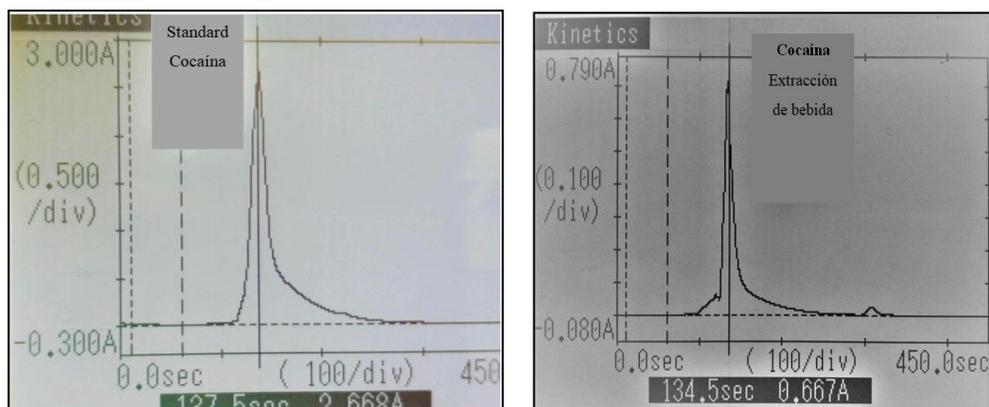


Figura 8. Espectros de standard de cocaína y muestras en bebidas analcohólica

C) Investigación de Adulterantes Mas Comunes

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas cualitativas para la detección de cocaína y algunos adulterantes más comunes.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas de identificación física y químicas.

- Determinar cocaína y adulterantes en muestras de interés toxicológico y legal.
- Interpretar los resultados.

Fundamento de la Técnica

Se hacen observaciones a simple vista y bajo luz U.V, ensayos de solubilidad y pH. Además, se realiza un estudio analítico de tipo cualitativo para identificar adulterantes comunes como: Novocaína, carbonato ácido de sodio (bicarbonato), ácido bórico, cloruro de sodio, etc.

Materiales y Métodos

Reactivos:

1. AgNO₃ al 5 %.
2. HCl al 1 %.
3. Solución saturada de permanganato de potasio.
4. Metanol.
5. H₂SO₄ (concentrado).

Actividades a Desarrollar

1- Observación a Simple Vista: extender la muestra sobre cartulina o papel, que no tenga fluorescencia, y observar a simple vista y luego bajo lupa.

Cocaína: cristales blancos nacarados.

Novocaína: cristales blanco mate, ligeramente amarillentos que se intensifica por exposición a la luz.

2- Observación Bajo Luz Ultravioleta.

Cocaína: muestra con aspecto brillante.

Novocaína: muestra con fluorescencia blanco-azulada.

Luego, repartir la muestra en tres pequeñas porciones, dos de ellas colocarlas en sendos tubos (*Tubo 1* y *Tubo 2*) de ensayo, y la tercera en una cápsula de porcelana.

3- Solubilidad en Agua Destilada.

Tubo1

Una pequeña fracción de la muestra se coloca en un tubo de ensayo y se trata con 2 mL de agua destilada. Observar si la disolución es incompleta. De existir cierta proporción de ácido bórico la disolución será incompleta. Una muestra de cocaína pura, en forma de clorhidrato, es totalmente soluble en agua destilada.

Utilizar este mismo tubo para la determinación de pH e ión cloruro.

4- Reacción de la Solución Acuosa (pH).

En general la reacción es ácida. Es alcalina en caso de existir carbonato ácido de sodio, (bicarbonato).

5- Identificación Del Ión Cloruro.

Unos mg de la muestra disuelta en 2 - 3 mL de agua destilada se los trata con una gota de nitrato de plata al 5 %. La aparición de un precipitado blanco indica la presencia de ión cloruro.

6- Ensayo Con Permanganato en Medio Ácido.

Tube2

A unos mg de la muestra disuelta en unos mL de ácido clorhídrico al 1 %, se le adicionan gota a gota y agitando solución saturada de permanganato de potasio.

Precipitado violeta neto: cocaína pura, en este caso observar la forma cristalina al microscopio haciendo un blanco de clorhidrato de cocaína. Los cristales de permanganato de cocaína son tabletas rectangulares con algún ángulo quebrado o recortado.

Precipitado castaño: En la muestra existen sustitutos reductores.

7- Investigación de Ácido Bórico:

Cápsula de porcelana

Se fundamenta en la formación del ester metil-bórico. **Bajo campana**, en una cápsula de porcelana de 8 - 10 cm de diámetro colocar unos centigramos de la muestra y se agregan 3 mL de metanol puro más 1 - 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado; mezclar bien y llevar a habitación oscura (o apagar la luz de la campana). Inflamar el alcohol:

Si existe ácido bórico los bordes de la llama aparecen de color verde esmeralda (observar atentamente ya que la llama es fugaz).

En caso negativo la llama es azul.

Referencia

Lorenzo Fernández P., Ladero Quesada J. M., Leza Cerro J. C., Lizasoain Hernández I., 2009, *Drogodependencias: farmacología, patología, psicología, legislación*, Editorial Médica Panamericana.

Gisbert Calabuig, J. A. 2004. "Medicina Legal y Toxicología". Masson-Salvat Medicina.

Fiorenza Biancucci G., González D., Pérez A., Ridolfi A., Strobl A., 2008. "*Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos para Laboratorios de Baja Complejidad*". Publicado por Asociación Toxicológica Argentina ISBN: 978-987-24163-0-0 Bs. As. Argentina

Freye E., 2009, *Pharmacology and Abuse of Cocaine, Amphetamines, Ecstasy and Related Designer Drugs*, Springer.

Ley de Estupefacientes, Ley N° 23.737

Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. "*Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología*". Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 16

Anfetaminas

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas cualitativa para la detección de anfetaminas.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas de extracción e identificación cromatográfica.
- Determinar anfetaminas en muestras de interés toxicológico y legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

Incluye este grupo una serie de sustancias obtenidas por síntesis química. Son fenil-etilaminas sustituidas. Los principios activos más importantes son la anfetamina (beta-fenil-isopropil-amina) y la d-metaanfetamina (metil-anfetamina).

Las anfetaminas presentan efecto estimulante del SNC, anorexígeno y entactógeno o alucinógenos. Las vías de administración son la oral y la parenteral (sobre todo la vía intravenosa). Por vía intravenosa los efectos son mucho más intensos que por vía oral, produciéndose una sensación calificada como *flash* o *rush*. Se han utilizado como sustancias aceleradoras de los efectos de los alucinógenos, fundamentalmente el LSD, también alucinógeno. Se absorben rápidamente por vía oral y parenteral, siendo metabolizadas en el hígado por procesos de oxidación.

Su mecanismo de acción se basa en la estimulación de todos los sistemas centrales que utilizan como neurotransmisores la dopamina y la noradrenalina, favoreciendo su liberación e inhibiendo su inactivación al bloquear su recaptación. Actúan estimulando directamente los receptores dopaminérgicos y noradrenérgicos, acción simpáticomimética. Los efectos son excitación, supresión del sueño y de fatiga, y anorexia.

La clínica de la intoxicación comienza con agitación, hiperactividad, insomnio, angustia, irritabilidad, taquicardia, hipertermia, sudoración abundante y midriasis. Pueden aparecer crisis convulsivas. De esta fase, dependiendo de la dosis, se pasa con mayor o menor rapidez a un cuadro confusional con ansiedad, alucinaciones, delirio y trastornos de la conducta que simulan un brote esquizofrénico de tipo paranoide. Existen hiperestesia sensorial, sequedad de la boca y mucosas, náuseas y vómitos, y dolores abdominales. Pueden aparecer nistagmus, vértigo, mioclonías, dolores musculares, ataxia y convulsiones, pasando a un cuadro de coma y, si la intoxicación es lo suficientemente intensa al fallecimiento del sujeto.

El tratamiento de las intoxicaciones por vía oral, si han transcurrido menos de 6 h desde la ingestión y no hay depresión del nivel de conciencia, se debe realizar un tratamiento evacuante mediante lavado gástrico, vómitos y administración de carbón activado. Si el paciente presenta un cuadro de excitación intensa, se administrarán benzodiazepinas. Si el cuadro es muy intenso o presenta delirios y alucinaciones, pueden aplicarse neurolépticos. En los casos leves pueden administrarse las benzodiazepinas por vía oral.

Fundamento de la Técnica

Anfetamina y compuestos relacionados, poseen la propiedad de ser solubles al estado de bases en medio orgánico y alcalino. Aprovechando esta característica se las extrae y posteriormente se las identifica realizando cromatografía en capa fina.

Materiales y Métodos

Muestras: Orina

Reactivos:

1. NaCl (sólido).
2. NaCl (solución saturada).
3. NaOH.
4. Bencedrina al 1%.
5. Metanol.
6. Amoniaco.
7. Solución metílico de I₂ al 1%.
8. Reactivo de Munier – Macheboeuff: Mezclar en el momento de usar: 10 mL de agua destilada, 2 mL de ácido acético, 1 mL de solución B y 1 mL de solución A (2 mL de solución A más 2 mL de solución B; luego 4 mL de ácido acético y 20 mL de agua destilada).

Solución A: pesar 2 g de subnitrito de bismuto ($4\text{BiNO}_3(\text{OH})2\text{BiO}(\text{OH})$) y llevar a solución con 25 mL de ácido acético y 100 mL de agua destilada.

Solución B: pesar de ioduro de potasio 4 g y llevar a 100 mL con agua destilada.

Actividades a Desarrollar

1. Colocar (25 mL) 10 mL de una muestra de orina en una ampolla de decantación.
2. Agregar NaCl sólido hasta saturación.
3. Agregar NaOH hasta verificar su alcalinidad con un papel tornasol. Agregar (25 mL) 10 mL de éter etílico.
4. Agitar con cuidado! Extraer la fase orgánica.

5. Adicionar a la capa orgánica 10 mL de una solución saturada de NaCl para lavar la capa etérea, separar y si es necesario filtrar.
6. Llevar a un vaso de precipitación y evaporar a baño maría con mechero apagado hasta volumen de 2-3 mL (anfetaminas son volátiles a altas temperaturas).
7. Se trasvasa a un tubo de ensayo con tapa plástica y desde allí se siembra en una placa de sílica-gel.
8. Sembrar en paralelo un testigo.

Solventes: metanol- amoniaco (100: 1,5)

Revelador: solución metílico de I₂ al 1% (Revelar bajo campana)
o Munier-Macheboueuff

Resultado: positivo, color naranja (naranja-rojo).

Referencias

Lorenzo Fernández P., Ladero Quesada J. M., Leza Cerro J. C., Lizasoain Hernández I., 2009, *Drogodependencias: farmacología, patología, psicología, legislación*, Editorial Médica Panamericana.

Goodman Gilman A., Brunton L. L., Chabner A. C., Knollmann B. C., 2011, *Goodman & Gilman las bases farmacológicas de la terapéutica*, Mc Graw Hill.

Freye E., 2009, *Pharmacology and Abuse of Cocaine, Amphetamines, Ecstasy and Related Designer Drugs*, Springer.

Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. *"Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología"*. Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 17

Plaguicidas Fosforados

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas cualitativa para la detección de plaguicidas fosforados.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas de extracción e identificación cromatográfica.
- Determinar plaguicidas fosforados en muestras de interés toxicológico y legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

Los insecticidas organofosforados son sustancias biodegradables en la naturaleza, sin tendencia a acumularse en las grasas del organismo, que forman parte del grupo de insecticidas llamados “de contacto”, por absorberse por intermedio de los lípidos del caparazón de los insectos; son muy activos contra un gran número de especies de insectos, todo lo cual hace de ellos los insecticidas más ampliamente extendidos en la actualidad.

Todos ellos derivan de la molécula del ácido fosfórico. Los insecticidas fosforados orgánicos se usan de forma exclusiva con fines agrícolas. Se emplean puros, mezclados con disolventes o sustancias inertes, en forma de polvos, en soluciones, en papeles para quemar, en aerosoles. etc.

La etiología de las intoxicaciones es accidental, en su mayor parte de origen profesional, afectando a los obreros que trabajan en la preparación de los insecticidas o en la aplicación de éstos a las plantaciones. También se conocen algunos casos entre los pilotos que trabajan en fumigaciones aéreas con estos insecticidas. Se han comunicado intoxicaciones alimentarias debidas al consumo de vegetales tratados con insecticidas y no sometidos al necesario lavado. También hay intoxicaciones de tipo suicidas. Se han hecho más frecuentes a medida que se ha extendido el uso de los organofosforados, al encontrar más facilidades para disponer de ellos. Se dan muy especialmente, como es lógico en el medio agrícola.

La absorción de los ésteres fosforados orgánicos tiene lugar fácilmente por todas las vías. A través de la piel se absorben con rapidez.; más rápida aún es la vía digestiva: la absorción respiratoria es casi instantánea. Todos los insecticidas organofosforados se comportan como potentes anticolinesterásicos y actúan de una manera selectiva sobre el sistema neurovegetativo. Su acción específica consiste en combinarse con las colinesterasas quedando estas enzimas inactivadas por lo que ya no pueden realizar su papel fisiológico de

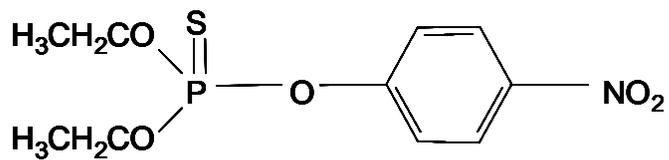
hidrolizar la acetilcolina. Se acumulan así elevadas cantidades de acetilcolina en las sinapsis, con lo que se producen grandes alteraciones en la transmisión nerviosa, al prolongarse su efecto de forma excesiva.

La primera consecuencia es un aumento del tono del parasimpático afecta la pupila produciendo miosis, en la musculatura intestinal aumenta el peristaltismo y a nivel bronquial broncoconstricción; en las glándulas salivales hipersecreción, sobre el nódulo sinusal bradicardia y bloqueo del nódulo auriculoventricular. El cuadro de intoxicación se inicia rápidamente en general a la media hora de la absorción, aunque puede retrasarse hasta 3 ó 4 horas. El cuadro o efecto acetilcolínico, corresponde una hiperexcitabilidad general del vago que se traduce en los siguientes síntomas: miosis, vómitos, calambres abdominales, sialorrea, sudoración, tenesmo, incontinencia de heces y orina, hipersecreción bronquial, hipotermia y edema agudo de pulmón.

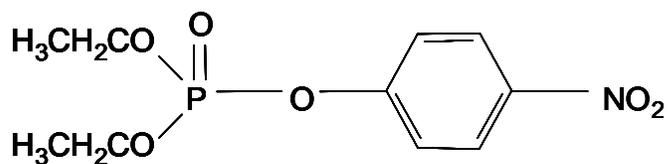
Si la acción de los ésteres fosforados es más intensa y persistente, se añade un segundo efecto: da lugar a un estímulo intenso sobre las fibras motrices, cuya excitación se traduce por fenómenos neuromusculares nicotínicos: temblores, convulsiones y, por último, parálisis muscular. En los casos más intensos se añade un broncoespasmo con signos de asma y la bradicardia acentuada puede conducir al paro cardíaco

En esta fase nicotínica se presenta síntomas correspondientes a la estimulación de las fibras motoras a la cual se unen los efectos centrales. Esta sintomatología consiste en sacudidas musculares que se localizan inicialmente en párpados y lengua, y después en los costados de la cara y cuello, generalizándose, por último, a todo el organismo y aumentando en su intensidad hasta dar un cuadro convulsivo de tipo epileptiforme; luego de este último estadio se produce una parálisis motora que se localiza en los músculos respiratorios, con la correspondiente asfixia. Al síndrome convulsivo se añade hipotensión, que puede conducir a un colapso generalizado y detención respiratoria y cardíaca.

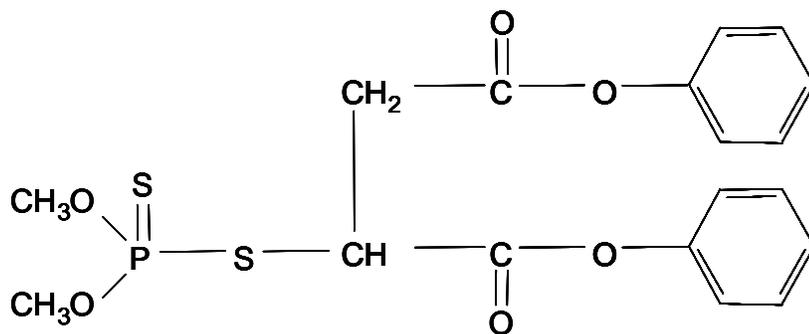
El diagnóstico se caracteriza por la determinación de la actividad de colinesterasas en suero y eritrocitaria y determinación de insecticidas fosforados orgánicos en muestras biológicas. El tratamiento específico de estas intoxicaciones es con oximas y sulfato de atropina, que debe administrarse por vía intravenosa y de ser necesario diazepam.



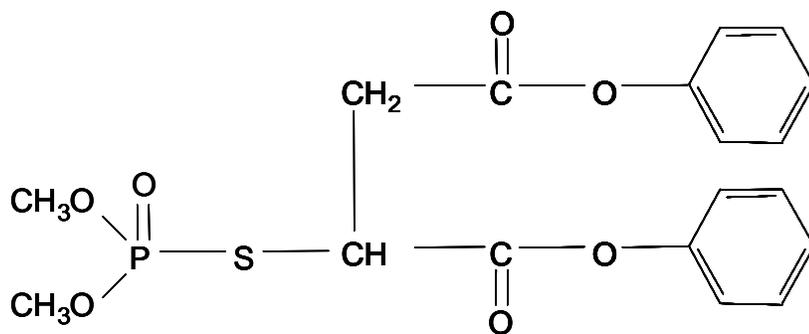
Parathión



Paraoxón



Malathión



Malaoxón

Figura 9. Formulación de diversos plaguicidas fosforados.

Fundamento de la Técnica

En primer lugar, se realiza una extracción del plaguicida con una mezcla de solventes orgánicos (éter etílico - éter de petróleo), y posteriormente se realiza una cromatografía en capa delgada observándose manchas de color amarillo sobre fondo violeta con el azul de bromo fenol y que luego viran a azul-violáceo con fondo amarillo al aplicar el segundo revelador.

Materiales y Métodos

Muestra: Sangre

Reactivos:

1. Éter etílico.
2. Éter de petróleo.
3. Hidróxido de sodio al 40 %.
4. Acetato de etilo.
5. Hexano.
6. Acetona.
7. Testigo de paratión.
8. Ácido Acético al 5 %.
9. Azul de Bromo Fenol: se disuelven 0,05 g de azul de bromo fenol en 10 mL de acetona, luego diluir a 100 mL con nitrato de plata al 1 % p/v en una mezcla de agua destilada: acetona (3:1).

Actividades a Desarrollar

1. Tomar 4 mL de sangre y extraer con 10 mL de mezcla éter etílico / éter de petróleo (30:70) agitando durante 5 a 10 minutos.
2. Recoger la fase etérea y evaporar a seco en baño maría.
3. Retomar con acetato de etilo y sembrar placa cromatográfica. Sembrar patrones de organofosforados sospechados de su presencia en la muestra.

Solventes: hexano - acetona (5:1)

Reveladores: 1) Revelar en primer término con azul de bromo fenol

Observar coloración de las manchas

Calentar a 80 °C 10 minutos.

Observar coloración de las manchas

2) Revelar en segundo término con ácido acético al 5 %.

Observar coloración de las manchas

Referencias

- Gisbert Calabuig, J. A. 2004. *"Medicina Legal y Toxicología"*. Masson-Salvat medicina.
- Fiorenza Biancucci G., González D., Pérez A., Ridolfi A., Strobl A., 2008. *"Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos para Laboratorios de Baja Complejidad"*. Publicado por Asociación Toxicológica Argentina ISBN: 978-987-24163-0-0 Bs. As. Argentina.
- Cameán A. M., Repetto M., 2006, *Toxicología Alimentaria*, Ediciones Díaz de Santos.
- Stenersen, J., 2004, *Chemical pesticides: mode of action and toxicology*, CRC Press.
- Olga Liliana Anguiano y Cristina Monica Montagna (Editoras), 2011, *"Clasificación y Toxicología de Plaguicidas"*. Editorial Educo. Neuquén-Argentina.
- Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia López Sarmiento (Coordinadores). 2004. *"Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología"*. Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 18

Química Legal: Manchas de Sangre

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas físicas y químicas para la detección de manchas de interés legal.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas de levantamiento de muestras y determinación de la naturaleza sanguínea de la mancha.
- Determinar naturaleza sanguínea de la mancha en muestras de interés legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

La criminalística es la ciencia que estudia los *indicios* dejados en el lugar del delito, gracias a los cuales pueden establecerse, en los casos más favorables, la relación entre víctima/s, sospechoso/s y muestras halladas en el lugar del hecho; la identidad del criminal y las circunstancias que concurrieron en el hecho delictivo.

En la investigación pericial de un indicio se recorren cuatro grandes etapas.

1. La búsqueda en la escena del crimen.
2. Su recogida y envío al laboratorio.
3. Los exámenes analíticos y su interpretación.
4. La elaboración del informe pericial y actividad ante los Tribunales.

Por mancha se entiende toda modificación de color, toda suciedad o toda adición de una materia extraña, visible o no, en la superficie del cuerpo humano, sobre instrumentos o sobre un objeto cualquiera determinadas por el depósito de un producto líquido, blando y algunas veces sólido, de cuyo estudio se pueden establecer relaciones de la intervención o participación de una persona o cosa en un hecho delictivo. La sangre es el vestigio más importante y el más frecuente. Cuando se encuentre, debe ser cuidadosamente estudiada.

El aspecto de las manchas varía con la antigüedad y el soporte sobre el que recaen. En los tejidos absorbentes y claros las manchas presentan un color rojo oscuro, que con el tiempo tiende a ennegrecerse más. Si las manchas de sangre han sido lavadas con agua, el color se hace rosa y el pigmento difunde al tejido de un modo irregular con lugares más densos que otros. El aspecto de la mancha de haber sido lavada debe alertar al perito porque lavandinas y ácidos modifican las características estructurales de los componentes de la mancha dando lugar a causas de error en la determinación. En los tejidos oscuros las manchas se visualizan

mal, por lo que se hace a veces necesario emplear el reactivo de luminol para hacerlas aparentes.

Los principales problemas que el laboratorio de criminalística debe resolver con relación a las manchas de sangre son:

1. Diagnóstico genérico: es decir, demostrar la naturaleza sanguínea de la mancha.
2. Diagnóstico específico: demostrar que la sangre es humana o no, especie animal a la que corresponde la sangre.
3. Diagnóstico Individual: determinación de grupo sanguíneo; y con el ADN determinar a qué individuo pertenece.
4. Diagnóstico del sexo del individuo de quien procede la sangre y de la región anatómica en que se produjo la hemorragia.
5. Data de una mancha de sangre: antigüedad de la mancha.

En el diagnóstico genérico, a menudo, el aspecto de una mancha es muy demostrativo de que se trata de sangre, otras veces su apariencia es menos clara. Tanto en un caso como en otro, la prueba de orientación debe ser confirmada en su naturaleza para que tenga valor. Pero donde las técnicas analíticas adquieren la mayor importancia es para detectar pequeñas manchas invisibles o inaparentes o para excluir como sangre una mancha que lo parece por su forma y aspecto. Habitualmente se emplean dos tipos de pruebas: pruebas de orientación, que a su falta de especificidad oponen una gran sensibilidad, y pruebas de certeza, específicas.

Las pruebas de certeza se basan en poner de manifiesto algún elemento característico de la sangre: elementos formes o hemoglobina. Sobre la base de estos principios y de acuerdo con la metodología empleada se pueden dividir en técnicas microscópicas, cristalográficas, espectroscópicas y cromatográficas.

- Técnicas microscópicas: tienen como fundamento el poner de manifiesto los elementos formes de la sangre, cuya presencia demuestra sin lugar a dudas la naturaleza sanguínea de la mancha. Tiene dos grandes ventajas: si el examen de la muestra es directo, no modifica la prueba, y cuando el diagnóstico es positivo, puede adelantar datos referentes a la especie.
- Técnicas cristalográficas: estas técnicas se basan en la existencia de ciertos derivados de la hemoglobina que tienen tendencia a cristalizar. Los más importantes son las sales halogenadas de la hematina y el hemocromógeno.
- Técnicas espectroscópicas: tienen por objeto obtener el espectro de absorción de la hemoglobina y de alguno de sus derivados, como prueba de la naturaleza sanguínea de la mancha. Si se interpone una solución hemoglobínica en el camino de un rayo de luz

blanca, la luz emergente sufre la absorción de dos bandas, α y β , en la zona del amarillo. Ello puede visualizarse por un espectroscopio de visión directa o medirse por un espectrofotómetro.

- Técnicas cromatográficas: estas técnicas aprovechan la propiedad fisicoquímica de la hemoglobina, que le confiere una movilidad cromatográfica concreta (R_f) cuando se desarrolla en un solvente adecuado.

Las pruebas de orientación son extraordinariamente sensibles, por lo que permiten demostrar trazas de sangre a diluciones del 1:200.000. Carecen en cambio de especificidad. Se basan en la presencia en la sangre de peroxidasa que son capaces de descomponer un peróxido (agua oxigenada, peróxido de bario) desprendiendo oxígeno nascente el que oxida a un indicador produciendo color. La prueba tiene valor cuando es negativa dado la alta sensibilidad de las mismas, sirviendo entonces para ratificar la negatividad de las pruebas de certeza que pueden deberse a la escasez de material sanguíneo de la mancha sospechosa. Una reacción positiva, en cambio, no autoriza a establecer la naturaleza sanguínea de la mancha. En efecto, diversas manchas vegetales (jugos de frutas, patatas, etc.) y orgánicas (heces, semen, pus, etc.) dan resultados positivos por contener catalasas o peroxidasa. Se ha puesto de manifiesto que ciertas sustancias reductoras, vitamina C presentes en ciertos jugos vegetales, cuando están a la concentración adecuada, podrían negativizar la reacción dando falsos negativos.

Los hematíes pueden suministrar datos para el diagnóstico específico atendiendo a su forma, presencia o ausencia de núcleo, y tamaño. Los hematíes son redondos en los mamíferos, a excepción de los camélidos, y elípticos en las aves, reptiles y batracios. Por lo que respecta al núcleo, los mamíferos tienen hematíes anucleados, mientras que aves, reptiles y batracios los tienen nucleados.

El segundo punto que el perito debe resolver es establecer si la sangre es humana o no. Al respecto, se han descrito diferencias no sólo entre las especies, sino incluso individuales, basadas en la composición de la globina y las secuencias de aminoácidos en las cadenas alfa y beta. Así, en la especie humana se han individualizado más de 15 tipos de hemoglobinas y un estudio completo de la estructura de la hemoglobina puede establecer especificidad de especie y de edad (Hb fetal), y características patológicas (anemia drepanocítica y talasemia), con lo que eventualmente se llegaría a la identificación individual y racial (anemia de Cooley).

La antigüedad de una mancha de sangre sólo puede establecerse en forma aproximada.

Determinación de la Naturaleza Sanguínea de la Mancha

A.- Reacciones De Orientación

Fundamento De La Técnica

Las siguientes reacciones de color (Adler, Kastle-Mayer, Mendinger) se fundamentan en la investigación de peroxidases sanguíneas, las cuales en presencia de agua oxigenada desprenden oxígeno. Este es revelado mediante un indicador de oxidación cuyo cambio de color señala la positividad de la reacción.

Materiales y Métodos

Reactivos:

1. Solución fisiológica.
2. Reactivo de Adler: bencidina alcohólica al 1 %, acidificada con unas gotas de ácido acético.
3. Reactivo de Kastle-Mayer: Tomar 2 g de fenolftaleína y adicionarle 30 g de hidróxido de potasio, 100 mL de agua destilada y 20 g de polvo de cinc. Hervir hasta decoloración total, filtrar en caliente y conservar en frasco oscuro herméticamente cerrado.
4. Reactivo de Mendinger: tomar 1 g de leucoverde de malaquita ($C_{23} H_{26} N_2$) y adicionarle 100 mL de ácido acético glacial y 150 mL de agua destilada. Agregar polvo de cinc y hervir hasta decoloración.
5. Agua oxigenada al 3 % de preparación reciente.

Actividades a Desarrollar

Trabajando con guantes, realizar cuatro impresiones de Taylor (1, 2, 3 y 4) de la siguiente forma: Sobre la mancha sospechosa colocar un papel de filtro embebido en solución fisiológica y hacer presión con un elemento limpio (cartón, taco de madera). A continuación, se procede a realizar las reacciones de color.

1.- Reacción de Adler. Sobre una impresión de Taylor colocar una gota de agua oxigenada y luego una gota de reactivo de Adler (una gota de reactivo de Adler y luego una gota de agua oxigenada).

Observar color

2.- Reacción de Kastle-Mayer: Proceder de manera similar con el reactivo de Kastle-Mayer.

Observar color

3.- Reacción de Mendinger. Proceder de manera similar con el reactivo de Mendinger.

Observar color

* Se seleccionará la impresión más diluida, impresión de Taylor, la cual se secará en lo alto de la llama del mechero hasta sequedad total y se reservará en un vidrio de reloj para hacer el examen luminiscente de la página 88.

B.- Reacciones De Certeza

1.- Cristalográficas

Fundamento de la Técnica

Se basan en la existencia de ciertos derivados del grupo Hem de la hemoglobina, los cuales poseen la propiedad de formar cristales característicos.

Materiales y Métodos

Reactivos:

1. Reactivo de Bertrand: tomar 1 g de cloruro de magnesio y adicionar 5 mL de glicerina de 30 %, 1 mL de agua destilada y 20 mL de ácido acético glacial.
2. Reactivo de Takayama: tomar 3 mL de hidróxido de sodio al 10 % y adicionar 3 mL de piridina, 3 mL de solución de glucosa y 10 mL de agua destilada.
3. Reactivo de Nina Asvadurova: 0,2 g de sulfato de hidracina, 2,5 mL de piridina pura y 10 mL de hidróxido de sodio al 10 %.
4. Reactivo de Teichman: ácido acético.

Actividades a Desarrollar

Cristales de clorhidrato de hematina o de Teichman

Se pueden obtener con el reactivo de Bertrand o con el reactivo de Teichman (ácido acético).

Reacción de Bertrand: Obtener un macerado de la mancha con agua destilada, colocar unas gotas en un portaobjetos, agregar 2 gotas de reactivo de Bertrand y colocar un cubreobjetos. Calentar unos segundos sobre una llama pequeña y luego cortar 2 o 3 veces la llama. Cuidar de no quemar el preparado.

Observar al microscopio, describir y dibujar:.....

Reacción de Teichman: Obtener un macerado de la mancha con agua destilada, colocar unas gotas en un portaobjetos, agregar 2 gotas de reactivo de Teichman y colocar un cubreobjetos. Calentar unos segundos sobre una llama pequeña y luego cortar 2 o 3 veces la llama.

Observar al microscopio describir y dibujar:.....

Cristales de Derivados de Hemocromógeno

Estos cristales se pueden obtener con el reactivo de Takayama o con el reactivo de Nina Asvadurova.

Reacción de Takayama: evaporar unas gotas del macerado en un portaobjetos en lo alto de la llama del mechero (50 – 60 °C), colocar un cubreobjetos y por capilaridad adicionar una gota del reactivo de Takayama o Asvadurova. Calentar.

Observar al microscopio una vez frío describir y dibujar.....

2.- Pruebas Espectroscópicas

Fundamento de la Técnica

Cuando la mancha de sangre no está muy alterada, puede obtenerse por maceración en agua destilada una solución sanguínea al 3 % aproximadamente. Si observamos esta solución con un espectroscopio de bolsillo, aparecerán en el espectro visible, las bandas de absorción características correspondientes a la oxihemoglobina. Si la misma se trata con un reductor como el ditionito de sodio, se verá la banda de Stoke, correspondiente a la hemoglobina reducida.

Actividades A Desarrollar

Dibujar:

Espectro de la oxihemoglobina

Espectro de la hemoglobina reducida

3.- Examen Luminiscente

Fundamento de la Técnica

La Hemoglobina y sus derivados que poseen un átomo de hierro no son fluorescentes, pero cuando lo pierden por acción del ácido sulfúrico concentrado adquieren la propiedad de luminiscencia.

Actividades a Realizar

1. En un vidrio de reloj colocar la cuarta impresión de Taylor, elegir la más diluida, bien seca, y observar a la luz ultravioleta.
2. Adicionar sobre la zona manchada 1 gota de ácido sulfúrico concentrado, dejar actuar unos minutos y observar nuevamente a la luz ultravioleta. Anotar resultado:.....

Referencias

- Gisbert Calabuig, J. A. 2004. *"Medicina Legal y Toxicología"*. Masson-Salvat medicina.
- Newton D. E., 2007, *Forensic Chemistry*, Facts On File, Inc.
- Khan J. I., Kennedy T. J., Christian D. R., 2011, *Basic Principles of Forensic Chemistry*, Humana Press.
- Beran R. G., 2013, *Legal and Forensic Medicine*, Springer Berlin Heidelberg.
- Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. *"Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología"*. Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 19

Química Legal: Manchas de Esperma

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas físicas y químicas para la detección de manchas de interés legal.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas de levantamiento de muestras y determinación de líquido espermático en manchas, tejidos impregnados o mezcla de fluidos.
- Determinar naturaleza espermática en muestras de interés legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

El líquido espermático se puede presentar al investigador en tres formas distintas: como mancha, impregnando un tejido; como fluido, mezclado con otros fluidos corporales, como la secreción vaginal, o como semen o líquido espermático, como cuando se obtiene directamente del sujeto para una investigación de esterilidad. En el campo del derecho penal está relacionado con los delitos contra la libertad sexual. En efecto, entre las huellas que pueden resultar de la comisión de un delito contra la libertad sexual (agresión o abuso sexual) figuran las manchas de esperma sobre las ropas, el propio sujeto o la víctima, constituyendo así una prueba de la mayor importancia. Además, la presencia de esperma en la vagina puede ser el único dato para establecer al diagnóstico de la cópula en una mujer ya desflorada.

El esperma recién emitido es un líquido filante, cremoso, de color opalino que tiende al amarillo verdoso cuando pasa el tiempo y tiene olor típico. Consta de dos elementos distintos: las células o espermatozoides que proceden de los tubos seminíferos del testículo, y el plasma seminal, que procede del epidídimo, próstata, vesículas seminales y glándulas de Cooper.

El método para recoger el material de examen será diferente según el problema planteado. Cuando se trata de una investigación sobre la víctima de una agresión sexual, según que el acceso carnal sea por vía vaginal, rectal o bucal, se procederá a la búsqueda del líquido espermático: con un hisopo o una torunda de gasa para la toma vaginal y rectal. En la boca se hará una limpieza en la parte posterior de los incisivos centrales. Una parte del material se reservará sin manipular para la investigación de ADN (PCR), otra parte para la investigación química y otra para los componentes bioquímicos. Cuando el esperma lo encontramos en forma de mancha, se puede observar que la morfología de ésta varía según el soporte donde asienta.

En la piel, cuando se deseca, adopta el aspecto de una fina película, como de pegamento, que clásicamente se suele comparar a un “rastros de caracol”. Estas manchas deben buscarse tanto en la víctima como en el sospechoso en zonas típicas: pubis, cara interna de los muslos y labios mayores. Los pelos impregnados tienen un aspecto como engomado. En los tejidos absorbentes forma unas manchas típicas, como si el tejido estuviera almidonado. Si la mancha es reciente, tiene un olor típico.

Las prendas sospechosas deben ser examinadas a la luz ultravioleta de Wood. Las manchas de esperma dan una fluorescencia blanco-amarillenta que va ganando amarillo con el tiempo. El examen de fluorescencia permite diferenciarlas de las debidas a otros productos, como orina (fluorescencia celeste), pus, moco o secreción vaginal. Sin embargo, la fluorescencia a la lámpara de Wood no es específica del esperma.

Investigación de espermatozoides. *Ha sido denominada prueba de certeza de la naturaleza espermática de la mancha, cuando se ha puesto de manifiesto un espermatozoide completo en la mancha.* El hecho de no descubrir un espermatozoide completo no debe llevar a concluir que la mancha no es de esperma. Por todo ello se han desarrollado un número considerable de pruebas complementarias, que, realizadas con metodología idónea poseen una considerable importancia. Tales pruebas se basan en la composición cualitativa y cuantitativa, de este producto biológico. A saber:

1. Técnicas cristalográficas.
2. Técnicas electroforéticas.
3. Técnicas enzimáticas. Determinación de la fosfatasa ácida. Esta última se encuentra en gran cantidad en el líquido espermático, debido a su elevada concentración en la próstata, y líquido prostático.
4. Métodos inmunológicos. El líquido espermático posee componentes específicos, como espermatozoides y el antígeno de recubrimiento de los espermatozoides (SCA).
5. Espectrofotometría de absorción atómica. Se ha puesto de manifiesto que el líquido espermático tiene también un comportamiento peculiar en lo referente a su composición mineral. La determinación de Zn, Ca, Cu, Fe, K y Mg por espectrofotometría de absorción atómica permite obtener conclusiones válidas para el diagnóstico del esperma

A.- Reacciones de Orientación

1.- Fluorescencia Espermática

Actividades a Desarrollar

Observar a la luz ultravioleta la fluorescencia característica de la zona manchada.

2.- Microquímica Del Esperma

Fundamento de la Técnica

Se trata el extracto de la mancha con determinados reactivos y se obtienen derivados microcristalinos. Estos cristales se obtienen por la aparición de dos compuestos de descomposición del esperma, colina (cristales rómbicos amarillo castaño) y espermina (cristales en forma de agujas de color amarillo). Este ensayo da positivo a los 8 días de emitido el esperma, aproximadamente.

Materiales y Métodos

Reactivos:

1. Reactivo de Florence: tomar 1,56 g de ioduro de potasio y adicionar 2,54 g de iodo más 30 mL de agua destilada.
2. Reactivo de Barbeiro: solución acuosa saturada de ácido pícrico aproximadamente al 1 %.

Actividades a Desarrollar

La técnica es similar para el uso de los dos reactivos.

1. Hacer un macerado con agua destilada a partir de un trozo de tela manchada.
2. Colocar en un portaobjetos unas gotas del macerado y posteriormente unas gotas del reactivo correspondiente. Mezclar, cubrir, flamear y observar al microscopio.
 - Reactivo de Florence, cristales de ioduro de colina

Dibujar, describir:

- Reactivo de Barbeiro, cristales de picrato de espermina

Dibujar, describir:

B.- Reacciones de Certeza

1.- Observación de Espermatozoides Enteros

Fundamento de la Técnica

"El hallazgo de un espermatozoide entero es prueba irrefutable de la naturaleza espermática de la mancha."

Actividades a Desarrollar

Tomar un trozo de tela manchada, colocarla sobre un portaobjetos y agregar unas gotas de solución fisiológica. Se raspa muy suavemente la tela con un bisturí y se realiza un extendido el cual se seca a baja temperatura. Colorear 5 minutos con cristal violeta y luego lavar con cuidado con agua. Por último, se observa al microscopio por inmersión.

2.- Test de la Fosfatasa Ácida

Fundamento de la Técnica

Se fundamenta en la valoración colorimétrica del fenol liberado desde el sustrato por la fosfatasa ácida prostática del esperma.

Materiales y Métodos

Reactivos:

1. Hidróxido de sodio al 20 %.
2. Sustrato: fenilfosfatodisódico al 1 %. Estable en heladera por 2 semanas.
3. Buffer pH 4,9 - 5,0: tomar 2,1 mL de ácido acético concentrado y llevar a 175 mL con agua destilada, luego tomar 5 g de acetato de sodio y llevar a 325 mL con agua destilada. Luego mezclar las 2 soluciones o sea 175 mL de ácido acético 0,2 N y 325 mL de acetato de sodio 0,2 N.
4. Folin-Ciocalteu: hacer una dilución del reactivo de Folin Ciocalteu comercial (1:4) en agua destilada antes de usar.

Actividades a Desarrollar

Se toma 1 cm² de la tela de zona manchada, se adiciona 1,3 mL de agua destilada y se macera con varilla de vidrio. Repetir el procedimiento con un cm² en una zona de la tela no manchada para realizar el blanco.

Tubo A (Extracto testigo): tomar 10 mL de agua destilada y adicionarle 0,5 mL de extracto de la mancha. **No incubar** y agregar 4,5 mL de Folin Ciocalteu. Filtrar. Tomar 2 mL de filtrado, 18 mL de agua destilada y 1 mL de hidróxido de sodio al 20 %.

Tubo B (Sustrato Testigo): tomar 9 mL de buffer y adicionarle 0,5 mL de agua destilada más 1 mL de sustrato. Incubar 1 hora a 37 °C y agregar 4,5 mL de Folin Ciocalteau. Filtrar. Tomar 2 mL de filtrado, 18 mL de agua destilada y 1 mL de hidróxido de sodio al 20 %.

Tubo C (Prueba): tomar 9 mL de Buffer y agregarle 0,5 mL de extracto de la mancha más 1 mL de sustrato. Incubar 1 hora a 37 °C y agregar 4,5 mL de Folin Ciocalteau. Filtrar. Tomar 2 mL de filtrado, 18 mL de agua destilada y 1 mL de hidróxido de sodio al 20 %.

Tubo D (Blanco): tomar 9 mL de buffer y agregarle 0,5 mL de extracto de la zona no manchada más 1 mL de sustrato. Incubar 1 hora a 37 °C y agregar 4,5 mL de Folin Ciocalteau. Filtrar. Tomar 2 mL de filtrado, 18 mL de agua destilada y 1 mL de hidróxido de sodio al 20 %. Con este tubo se lleva a cero la escala del espectrofotómetro. Llevar los 4 tubos a 25 mL con agua destilada. Colocar a 37 °C durante 5 minutos y luego hacer lectura espectrofotométrica a 670 nanómetros.

Cálculos

- 1- Con el tubo D (Blanco) se lleva a cero para luego realizar las lecturas del tubo prueba y testigos.
- 2- Luego de realizar las lecturas correspondientes, se resta a la absorbancia del tubo prueba la de los testigos.
- 3- El valor final de absorbancia se debe comparar con una curva de calibración previamente realizada, con patrones de fenol de concentración creciente y equivalentes a unidades enzimáticas en un rango correspondiente para esperma humano. Las unidades pueden ser King Armstrong.

Se considera una unidad King Armstrong cuando 100 mL de suero liberan 1 mg de fenol, trabajando a 37 °C en 1 hora con 1 cm² del soporte macerado con 1 mL de agua destilada.

Curva de calibración de fenol

A partir de una solución de fenol de 100 mg% preparar diluciones de 10, 1 y 0,1 mg%. Con estas diluciones preparar patrones para alcanzar concentraciones de hasta 5 µg/mL. La curva debe contener valores de 200 µg/mL de fenol hasta 5 µg/mL.

Referencias

Gisbert Calabuig, J. A. 2004. "*Medicina Legal y Toxicología*". Masson-Salvat medicina.
Newton D. E., 2007, Forensic Chemistry, Facts on File, Inc.

Khan J. I., Kennedy T. J., Christian D. R., 2011, *Basic Principles of Forensic Chemistry*, Humana Press.

Beran R. G., 2013, *Legal and Forensic Medicine*, Springer Berlin Heidelberg.

Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores).
2004. "*Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología*". Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 20

Química Legal: Tintas

Objetivos:

- Comprender los fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas físicas y químicas para la investigación pericial de documentos.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas de identificación de tintas, edad de los documentos, adulteración, borrados y dobleces de documentos.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

Los documentos presentan 2 componentes fundamentales para la investigación pericial de los mismos:

- A. El papel, que es el soporte del documento y del cual existen de diversas calidades, por ejemplo, papel común para escritos de rutina, el papel para la emisión de DNI, cheques, facturas, papel de moneda, etc.
- B. El otro componente, es el pigmento escritural que puede dividirse en dos grandes grupos:
 1. *Las tintas*, son líquidos coloreados, que al ser depositados sobre el papel dejan por evaporación del solvente y/o por reacciones químicas de sus componentes residuos de color, intensidad y perennidad tales, que las hacen aptas para la ejecución de escrituras. Se incluyen productos que van desde líquidos muy fluidos (por ejemplo, las tintas a la anilina) hasta otros casi pastosos, además, de las tintas utilizadas en escrituras secretas.
 2. *Los lápices*, que contienen minas, en los que se incluyen lápices gráficos, copiativos y crayones.

La tinta mantiene un lugar de privilegio a la hora de medir el paso del tiempo y en los últimos años algunos problemas legales se han resuelto mediante el análisis de la tinta de bolígrafo, y por el impacto de nuevos productos y la tecnología que permiten disponer de otros medios confiables cuando se presentan casos de conflicto.

Otros elementos como líquidos correctores, cintas correctoras, cintas de transferencia de calor resistiva (para máquinas de escribir silenciosas), y muchos más, hacen necesario que el experto sepa reconocer su apariencia en el papel y tenga acceso a la información sobre el periodo de implantación. Elementos adjuntos a documentos pueden ser también relevantes en

relación a la edad, como broches, clips, cintas pueden dejar marcas indicando su presencia durante el lapso determinado.

Cuando un perito debe abordar problemas referentes a investigación documentológica, debe proceder siempre a un estudio exhaustivo, ordenado y detallado de todos los elementos constitutivos de un documento. Y por supuesto siempre se comienza con los exámenes físicos de observación meticulosa a simple vista, al trasluz, luz UV, por medio de lupas, para abordar luego exámenes químicos. Desde los no destructivos a los destructivos. En el caso de estos últimos siempre se requiere, previamente, la autorización explícita del Juez para la destrucción parcial o total del documento, si el análisis hubiera sido vía judicial.

Antes de comenzar con ensayos químicos se debe tener el cuidado de probar los reactivos en sectores no fundamentales del documento y en modo tan prolijo que la alteración del mismo sea mínima. El perito debe anotar en su cuaderno el lugar en que hizo la aplicación del reactivo, y los resultados del mismo. Hoy en día se dispone además de la posibilidad de ir dejando constancia mediante fotografías. Si fuera imprescindible alterar una parte fundamental del escrito, deberá solicitarse previamente la autorización pertinente. Convenientemente mediante la explicación por escrito a la autoridad que ordena la peritación del posible daño que sufrirá el documento sobre todo si será alterada la parte cuestionada. No comenzar el peritaje hasta la autorización formal.

Las pruebas periciales más frecuentemente solicitadas sobre tintas utilizadas en la confección de documentos consisten en:

1. Establecer si la tinta utilizada para confeccionar el texto es igual o distinta a la empleada en la confección de la firma y eventualmente, distintas partes del documento, por ejemplo: texto/firma, firma/fecha.
2. Determinar la fecha en que el documento ha sido confeccionado, para casos de documentos sin fecha (edad absoluta).
3. Determinar si la fecha ha sido confeccionada antes o después de la firma o del texto (edad relativa).
4. Establecer si en un mismo documento ha sido utilizada más de una tinta (lapicera).

En algunos casos menos frecuentes, en las pruebas periciales, puede solicitarse la composición de las tintas.

1.- Métodos Químicos Para la Estimación de la Edad de Las Tintas

Fundamento de la Técnica

Las tintas ferrogálicas contienen siempre una cierta proporción de iones Cl^- y SO_4^{2-} . Pero en general cualquier tinta puede contener dichos iones en variables proporciones.

Se ha comprobado que una vez asentada la escritura, dichos iones incoloros, no quedan estables en el rasgo, sino que se desplazan o migran progresivamente a través del papel, alcanzando distancias que guardan relación con la antigüedad del escrito.

En los Cl^- la difusión desde el trazo se completa recién al año de transcurrida la escritura.

En los SO_4^{2-} la difusión desde el trazo comienza luego de un año y se completa en 10 años.

De acuerdo a las experiencias adquiridas se considera que este método es de utilidad en el estudio confrontacional de diferencias de antigüedad entre distintas partes de un documento confeccionado con igual tinta y en un mismo soporte del mismo documento. Fuera de estas posibilidades el procedimiento no es apto.

A.- Difusión de Los Iones Cloruros Como Evidencia de la Edad

Los iones cloruros de la tinta contenida en un determinado trazo se ponen en evidencia por precipitación con Ag dando AgCl.

Posteriormente se adiciona una solución reductora mediante la cual la plata iónica se transforma en Ag^0 .

Materiales y Métodos

Reactivos:

1. Nitrito de sodio o potasio al 10 % (oxidante-precipitante).
2. Nitrato de plata al 1 %.
3. Ácido nítrico concentrado.
4. Solución reductora: 1 parte de formol al 35 % y 10 partes de hidróxido de sodio al 2 %

Actividades a Desarrollar

1. En un vaso de precipitación colocar 3 mL de solución de nitrito de sodio o de potasio al 10 %. Agregar gota a gota nitrato de plata al 1 % hasta total precipitación de nitrito de plata. Adicionar ácido nítrico concentrado, gota a gota, hasta la desaparición del trazo.
2. Se sumerge en la solución anterior un trozo de documento de 1 cm² de superficie, hasta que se decolore (por la mezcla nitroso/nítrico) formándose así cloruro de plata. La fracción orgánica es oxidada por el ión nitrito y el ión plata precipita con el cloruro de la tinta.
3. Lavar con agua 2 o 3 veces para eliminar el exceso del reactivo.
4. Volcar el agua y adicionar 3 mL de solución reductora. El cloruro de plata se reduce a Ag⁰, el cual es de color negro.
5. Lavar varias veces. Secar entre papel de filtro y observar.

Como resultado se obtiene una imagen negativa en la cual los trazos originales de la escritura se observan más claros que el resto del papel.

B.- Difusión de Iones Sulfato Como Evidencia de la Edad

Materiales y Métodos

Reactivos:

1. Solución de ácido perclórico (ClO₄H) al 5 %.
2. Permanganato de potasio al 1 %.
3. Agua destilada saturada con sulfato de plomo con unas gotas de sulfato de hidracina.
4. Sulfato de hidracina al 20 %.
5. Sulfuro de sodio 0,5 %.
6. Hidróxido de potasio 0,5 %.

Actividades a Desarrollar

1. Preparar el reactivo oxidante para el revelado de los iones sulfatos: una solución de ácido perclórico (ClO₄H) al 5 % en volumen, que contiene igual proporción de perclorato de plomo y unas gotas de permanganato de potasio al 1 %. En esta solución se sumerge la parte del documento a estudiar hasta la desaparición total del trazo. El ión sulfato forma una imagen blanca, insoluble.

2. Lavar el papel con agua destilada saturada con sulfato de plomo con unas gotas de sulfato de hidrazina como reductor (aquí se disuelve óxidos superiores de manganeso y desaparece el resto de permanganato).
3. Pasar el papel a un vaso conteniendo solución saturada de sulfato de plomo, dejar en contacto 10 minutos.
4. Finalmente tratar con una solución de sulfuro de sodio 0,5 % e hidróxido de potasio 0,5 % con lo que el sulfato de plomo del trazo se transforma en sulfuro, negro.

Como resultado se obtiene una imagen negativa en la cual los trazos originales de la escritura se observan más claros que el resto del papel, debido a la migración de los iones sulfatos.

C.- Oxidación Del Ion Ferroso Como Evidencia de la Edad

Fundamento de la Técnica

Los iones ferrosos que contienen las tintas, se oxidan paulatinamente a Fe^{3+} , luego de depositado el trazo y haberse expuesto al aire. Esta transformación suele ocurrir aproximadamente en una semana. El ensayo consiste en revelar la existencia de hierro ferroso que reacciona con α,α' -dipiridilo dando color rosado a rojo dependiendo de la cantidad de hierro en la tinta. Contrastar trazos o escrito dudoso.

Materiales y Métodos

Reactivo: α,α' -dipiridilo, preparar una solución de α,α' -dipiridilo al 1 % en HCl 0,5 N.

Actividades a Desarrollar

Colocar con pipeta capilar una gota de reactivo dipiridilo al 1 % en ácido clorhídrico 0,5 N sobre un trazo del documento. Se observa color rosado por reacción con hierro (II). Debe practicarse la misma operación sobre una zona de papel no escrita, para comprobar que no sean iones ferrosos del papel.

2.- Raspaduras y Enmiendas

Fundamento de la Técnica

Es frecuente que, durante un escrito, con la intención de mejorar o falsificar, la presentación o redacción se borre una parte utilizando: a) gomas, bisturí o Gillette, b) tachado, c) medios abrasivos, d) borra tintas químico (ácidos, hipoclorito).

Actividades a Desarrollar

- 1.- Observar a trasluz:.....

2.- Observar a la luz UV:

3.- Con pipeta capilar dejar caer una gota de solvente orgánico cerca de la zona supuestamente raspada. El solvente avanza, se detiene breves instantes donde hay desorganización de las fibras y luego penetra en la zona raspada.

4.- Con luz U.V. se observa distinta fluorescencia en la zona raspada.

3.- Estudio de Dobleces en el Documento.

Actividades a Desarrollar

1.- Identificar en el documento los sitios donde se encuentren trazos de tinta sobre dobleces y observarlos con lupa binocular.

2.- Si se observa que el trazo se corta en la zona del doblez, indica que el trazo fue realizado previo a la confección del doblez.

3.- Si se observa que el trazo no se corta, y que la tinta difunde, se engrosa en trazo, en la dirección del doblez, es indicativo que la escritura se realizó sobre el doblez.

4.- Métodos Químicos Para Restaurar Escritos Borrados

Actividades A Desarrollar

Se expone el papel a vapores de polisulfuro de amonio o de amoníaco, ácido tiociánico (HNCS) o vapores de Iodo. Estos reactivos revelan los restos de los constituyentes de las tintas que quedan en los intersticios del papel. Trabajar bajo campana con extractor encendido. Colocar el documento en la boca de un recipiente que contenga los reactivos a utilizar, observar y fotografiar rápidamente.

5.- Identificación de Las Tintas de Lapiceras a Bolilla. Cromatografía en Papel

Fundamento de la Técnica

La cromatografía resulta útil en los casos que se han efectuado modificaciones, agregado, enmiendas, etc, que, por haber sido hechas con una tinta de color similar a la original, supone al autor del fraude que serán inadvertidas, ignorando que 2 pigmentos de igual apariencia pueden tener distinta composición química, la cual será detectable por cromatografía. Los colorantes usados en las tintas de bolígrafos son solubles en alcohol.

Actividades a Desarrollar

Todos los colorantes que se utilizan en la composición de las tintas de lapiceras a bolilla son solubles en alcohol.

Solvente 1:

Alcohol etílico.....12,5 mL (25 mL)
Acetato de etilo.....6 mL (12 mL)
Agua.....30 mL (60 mL)
Amoníaco.....1,5 mL (3 mL)

Solvente 2:

Alcohol etílico.....12,5 mL (25 mL)
Acetato de etilo.....6 mL (12 mL)
Agua.....30 mL (60 mL)
Ácido fórmico.....1,5 mL (3 mL)

Preparar los 2 líquidos resolutivos, en primer lugar, para saturar las cámaras cromatográficas. Observar el nivel de los mismos para localizar el lugar correcto de siembra.

Realizar elusiones con alcohol desde las partes de documentos a estudiar.

Sembrar en papel o placa cromatográfica las muestras provenientes de eluidos de documentos y testigos de tintas diversas.

Tiempo de corrida: 1 Hora.

Dejar secar y observar en forma directa:.....

Observar por exposición a la luz U.V.

Referencias

Bonilla Carlos E. 2000. "Investigación documentológica" Ediciones La Rocca.

Beck Nancy, Caponi Maureen, y cols. 2003. "Investigaciones documentales" Ediciones La Rocca

Seaman Kelly Jan, Lindblom Brian S. 2006, "Scientific Examination of Questioned Documents", CRC Press Taylor & Francis Group.

Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia López Sarmiento (Coordinadores). 2004. "Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología". Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Trabajo Práctico de Laboratorio N.º 21

Química Legal: Pelos

Objetivos:

- Comprender fundamentos, ventajas y aplicaciones de técnicas físicas y químicas para la detección de pelos diversos de interés legal.
- Adquirir destreza en la ejecución de las técnicas de levantamiento de muestras, de observación al microscopio y determinación de pelos y diferenciación de pelos animales y fibras vegetales.
- Determinar entre fibras vegetales, pelo en muestras o evidencias de interés legal.
- Interpretar los resultados.

Introducción Teórica

El pelo tiene una gran importancia como evidencia, una gran resistencia a la destrucción, dadas su estructura y composición, sin embargo, pueden pasar inadvertidos por su pequeñez, y por su poco peso pueden ser transportados a otro lugar por agentes atmosféricos.

Los problemas médico-legales en los que pueden estar implicados los pelos son:

1. Delitos de lesiones: riñas, homicidios, accidentes de todo tipo.
2. Delitos contra la libertad sexual: agresiones y abusos sexuales.
3. Problemas de identificación: personas desconocidas, descuartizamientos.
4. Intoxicaciones: la mayoría de los xenobióticos y/o sus metabolitos, los opiáceos, drogas de abuso pueden determinarse en pelo, y algunos tóxicos minerales, como el plomo, arsénico y talio, se eliminan por el cabello y pueden ser investigados cuando ya han desaparecido de otros puntos del organismo.
5. Data de la muerte: el pelo de la barba tiene un crecimiento regular de 0,5 mm/día, que puede aprovecharse para establecer el momento de la muerte.

El pelo está compuesto en un 65 a 95 % por proteínas, 1 a 9 % lípidos, y de 0,1 a 5 % pigmentos (melanina). El pelo es un anexo de la piel que presenta una extremidad libre, un tallo y una extremidad incluida en la dermis, llamada raíz. La raíz asienta sobre el folículo que contiene el órgano generador del pelo o bulbo. Éste está fuertemente implantado y en algunas partes resulta difícil arrancarlo. El pelo cae espontáneamente por formación de otro nuevo que le empuja, se queratiniza y cae. El bulbo tiene interés médico-legal para diferenciar pelos caídos espontáneamente o de bulbo llano, y pelos arrancados, que no tienen bulbo. El tallo consta de tres partes que, de afuera hacia adentro, en un corte transversal, serían: cutícula, corteza y médula.

Cutícula. Es una delgada capa, no pigmentada, formada por células que al principio son cúbicas, después se van aplanando, pierden el núcleo, se queratinizan y se hacen transparentes.

Corteza. Es la responsable de la resistencia, elasticidad, forma y color del pelo. Está constituida por células muertas, que no se individualizan al microscopio por estar agrupadas. En general pueden obtenerse pocos datos de la corteza si no está pigmentada; por el contrario, si lo está, el examen de la corteza proporciona importantes deducciones: el pigmento puede ser difuso y granular, y en cuanto a la concentración varía desde la ausencia completa hasta una densidad tal que impide visualizar el interior del pelo. El color del pelo puede cambiar a lo largo de la vida por diversos motivos, tras el enterramiento tiende a adoptar un color rojizo.

Médula. Ocupa el eje del pelo, pero su presencia no es constante. Está constituida por una columna de células que se aprietan. Entre célula y célula hay espacios de aire que, al microscopio, aparecen oscuros e impiden el examen medular.

Como ha ocurrido con otros vestigios, la aplicación del estudio de ADN mitocondrial y nuclear a la identificación de los pelos ha relegado este capítulo a un lugar muy secundario. El conocimiento de la estructura química puede ser interesante, hay que distinguir en ella los elementos inorgánicos y los compuestos orgánicos. Los compuestos orgánicos mayoritarios del pelo son: queratina y melanina; y otros compuestos orgánicos minoritarios son: vitaminas, colesterol y ácido úrico. Los elementos inorgánicos más frecuentes son: arsénico, plomo, silicio, hierro y fosfatos.

Hoy adquiere importancia la determinación de xenobióticos en pelo, principalmente drogas de abuso en los casos de tratamiento de deshabituación solicitada y monitoreada vía judicial.

Actividades a Desarrollar

Observación Microscópica

En primer término, se visualizará y documentará si está manchado, tipo de suciedad, parásitos, afeites, tintes, etc. a simple vista y con lupa.

El pelo debe examinarse, tal como se ha encontrado con un microscopio ordinario. En segundo lugar, se observará:

1) *Extremidad libre*

- a) Recta
- b) Oblicua
- c) Desfleada
- e) En punta

2) Tallo

a) Cutícula

Hombre: Escamas delgadas, poco salientes y muy imbricadas.

Animal: Escamas gruesas, salientes y poco imbricadas.

b) Canal medular

Hombre:

- 1) Red aérea finamente granulosa.
- 2) Células medulares invisibles, indisociadas.
- 3) Índice medular menor de 0,3 mm (Ver fórmula en Pág. 104).
- 4) Vello fetal sin médula.

Animal:

- 1) Red aérea con vesículas más voluminosas.
- 2) Células medulares muy aparentes.
- 3) Índice medular mayor de 0,3 mm (Ver fórmula en Pág. 104).
- 4) Vello con médula en escalones o moniliforme

c) Corteza

Hombre

Sustancia cortical gruesa

Pigmentos en granulaciones homogéneas y pequeñas.

Animal

Sustancia cortical delgada

Pigmentos en granulaciones irregulares y más grandes que en el

hombre.

3) Raíz

Bulbo completo (caído espontáneamente)

Sin bulbo (arrancado)

Cortes Transversales

Realizar inclusión en parafina y posteriormente cortes con micrótopo para observar al microscopio.

1) Ubicación de la pigmentación

Hombre: Pigmentación con tendencia a ubicarse en la periferia.

Animal: Pigmentación con tendencia a ubicarse en forma más homogénea.

2) Determinación de Índices

$$\text{Índice Medular} = \frac{\text{Diámetro de médula}}{\text{Diámetro total del pelo}}$$

$$\text{Índice de Sección} = \frac{\text{Diámetro menor del pelo}}{\text{Diámetro mayor del pelo}}$$

Técnicas Complementarias

1) Tinción con violeta de metilo: Este colorante tiñe los pelos decolorados, no así los cabellos naturales claros.

2) Diferencias entre fibra vegetal y pelo.

a) Reacción de alfa-naftol: la muestra se pone en contacto con agua destilada más ácido sulfúrico concentrado y posteriormente se adicionan unas gotas de alfa-naftol.

Fibra vegetal: coloración violeta.

Pelo: no hay coloración y puede haber disolución.

b) Reacción de Timol: la muestra se pone en contacto con agua destilada más timol.

Algodón: coloración violeta.

Pelo: no hay coloración.

c) Quemado: quemar la muestra y observar.

Fibra vegetal: arde rápidamente, sin olor desagradable, sin formar botón o bolita en el extremo expuesto a la llama.

Pelo: arde con dificultad, con olor desagradable, a pelo quemado, y formando botón o bolita en el extremo expuesto a la llama.

Diagnostico Diferencial

Raza: el índice de sección es un importante dato para resolver el problema.

Edad: puede diferenciarse el vello fetal, cuya característica es no poseer médula y pigmento, del pelo de los niños. Pero a partir de cierta edad, los pelos no pueden diferenciarse con criterio seguro en función de la edad.

Región Del Cuerpo:

1) Pelos crespos con la médula en forma de riñón y relativamente cortos pueden corresponder a la zona pubiana.

2) Pelos lisos, con longitud entre 3 y 5 cm. aproximadamente y diámetro superior a 120 micras, pueden corresponder al bigote o barba.

3) Pelos con una longitud menor de 3 cm. y más finos, de 60 micras aproximadamente, pueden corresponder al tronco o a los miembros.

Diagnostico Individual

Este tipo de examen se realiza a través de diversas técnicas:

1. Determinación de grupos sanguíneos.
2. Determinación de DNA: Para realizar esta determinación es necesario tener células nucleadas, las cuales forman parte del folículo piloso. Por lo tanto, no es posible realizarla con cabellos cortados (sin bulbo). Es importante destacar que esta determinación es posible realizarla en cualquier fluido biológico (semen, sangre, etc.) y en restos de tejidos, huesos, etc.

Determinaciones Toxicológicas

Pelo puede ser una matriz de interés para demostrar la exposición laboral, ambiental, accidental, homicida, suicida o por adicciones, a diferentes xenobióticos, ya que en él pueden determinarse diferentes metales pesados, drogas, fármacos y metabolitos.

Referencia

Gisbert Calabuig, J. A. 2004. "*Medicina Legal y Toxicología*". Masson-Salvat medicina.

Newton D. E., 2007, Forensic Chemistry, Facts on File, Inc.

Khan J. I., Kennedy T. J., Christian D. R., 2011, *Basic Principles of Forensic Chemistry*, Humana Press.

Beran R. G., 2013, *Legal and Forensic Medicine*, Springer Berlin Heidelberg.

Mónica Talamoni, Gabriel Capranzano, Claudia Lopez Sarmiento (Coordinadores). 2004. "*Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología*". Editorial Eudeba. Buenos Aires-Argentina.

Legislación de Interés

Ley N° 17.132. Ley Ejercicio de la Medicina, Odontología y Actividades Auxiliares

Código Procesal Penal Ley N° 23.984

Ley de Lealtad y Juego Limpio en el Deporte. Doping Ley N° 24.819

Residuos Peligrosos. Generación, Manipulación, Transporte y Tratamiento, Ley Nacional N° 24.051

Ley Nacional N° 26247 de Armas Químicas o “Implementación de la Convención sobre la prohibición del desarrollo, la producción, el almacenamiento y el empleo de armas químicas y sobre su destrucción.”