



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Determinación de carboxihemoglobina en intoxicaciones
por
monóxido de carbono.**

TESINA

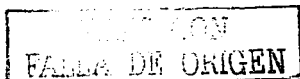
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Lic. Químico Farmacéutico Biólogo.

PRESENTA:

Alumna: Angélica Alejandra Martínez Luna.

Asesor: María de los Ángeles Vidal Millán.

Marzo de 2003





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedico esta tesina:

- **A mi esposo:**
Arsenio por todo su apoyo y confianza durante todo este tiempo en cual debido a su insistencia pude subir otro peldaño más en mi vida.
- **A mis pequeños:**
Luis Ángel, Yair Alejandro y a este pequeñito que viene en camino, por todas las alegrías que me dan y que me alientan a luchar para poder brindarles lo que merecen y un buen ejemplo de superación.
- **A mi madre:**
Por toda su ayuda, apoyo y comprensión, además de todos sus desvelos, palabras de aliento y confianza para poder llegar hasta este punto y no defraudarla.
- **A mi padre:**
Por todo su apoyo y por guiar mi camino.
- **A mis hermanos:**
Por su entusiasmo para alentarme en los momentos cuando sentía flaquear, sus consejos y su ayuda desmedida, en especial a Paly.
- Y a todas aquellas personas que de alguna manera estuvieron a mi lado, brindándome su apoyo incondicional y que de alguna manera contribuyeron al desarrollo de la presente.

ÍNDICE

Descripción de la tesina	3
Planteamiento del problema	3
Objetivos	4
Antecedentes históricos de la toxicología	5
Etiología de las intoxicaciones	6
- Condiciones que influyen en las intoxicaciones	7
Metabolismo de los tóxicos	7
Aspectos químicos del monóxido de Carbono	9
Factores que determinan la toxicidad del monóxido de carbono.	11
- Reacción del monóxido de carbono con la hemoglobina	11
Signos y síntomas de la intoxicación por monóxido de carbono.	13
Diagnóstico de la intoxicación por monóxido de carbono.	17
Destino y eliminación del monóxido de Carbono.	17
Intoxicación por exposición prolongada a bajas concentraciones de monóxido de carbono.	18
Tratamiento de la intoxicación por monóxido de carbono	19
Investigación toxicológica	19
Técnicas analíticas	
1) CUALITATIVAS	22
A) Microdifusión	22
B) Test para Monóxido de carbono-carboxihemoglobina	24
C) Sangre diluida	24
D) Prueba con hidróxido de sodio	24

TEBIS CON
FALLA DE ORIGEN

E)	Prueba con ácido tánico	24
F)	Prueba de Katayama	25
G)	Reacción con ferrocianuro de potasio	25
H)	Reacción con hematinas o metahemoglobinizantes	25
	2) CUANTITATIVAS	26
I)	Determinación espectrofotométrica de monóxido de carbono en sangre	26
J)	Método experimental con sangre termo coagulada	29
K)	Método por cromatografía de gases acoplado a Head Space- espectrometría de masas	30
L)	Método espectrofotométrico	31
M)	Método espectrofotométrico de Heilmeyer	33
	Diagnóstico postmortem	35
	Preservación de muestras	36
	Conclusiones	37
	Anexo 1	38
	Anexo 2	40
	Glosario	44
	Referencias bibliográficas	46

DESCRIPCIÓN DE LA TESIS.

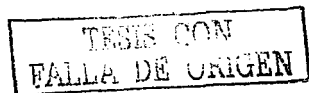
Realizar un estudio sobre los métodos y técnicas disponibles en la actualidad para la identificación y cuantificación de la carboxihemoglobina, en fluidos de personas intoxicadas con monóxido de carbono haciendo énfasis sobre la aplicación forense de dichas técnicas. Así mismo, se describirán las fases de la intoxicación y la importancia en la toma de muestra para su estudio químico.

Finalmente se propone una ruta analítica crítica objetiva y fácil de llevar a cabo para la identificación y cuantificación de la carboxihemoglobina.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a la gran necesidad que tiene el químico en el ámbito forense a utilizar técnicas para la identificación o cuantificación de alguna sustancia que se encuentre en el organismo, es indispensable la búsqueda de técnicas que sean de fácil acceso, así como el tiempo en el que se realicen sea corto.

El análisis de gases, es una operación altamente especializada, tanto en el material utilizado como en la técnica analítica; en los laboratorios de toxicología medico-legal lo habitual es investigar la presencia de un determinado gas y comprobar si un sujeto ha sufrido los efectos de un gas tóxico, este análisis recae sobre la sangre que debe contener el gas y de la cual hay que extraerlo para su identificación y cuantificación. Por ejemplo, el monóxido de carbono puede analizarse directamente mediante extracción y posterior análisis o bien indirectamente mediante el análisis de la carboxihemoglobina.



OBJETIVOS:

- Describir las técnicas para la determinación de la carboxihemoglobina (COHb).
- Realizar un análisis comparativo de las técnicas anteriores.
- Proponer una metodología confiable para aplicarla en laboratorios forenses.
- Clasificar las técnicas con base a la forma de identificación (directa o indirecta).

ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA TOXICOLOGÍA.

La toxicología es la rama de las ciencias médicas que estudia los tóxicos o venenos y sus efectos en el organismo (del griego, *toxicon*, venenoso; *logos*, estudio, tratado).

Tóxico es toda sustancia que al estar en contacto con el organismo por cualquier vía, y mediante mecanismos químicos o fisicoquímicos, produce alteraciones orgánicas o funcionales incompatibles con la salud o la vida.

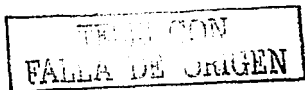
En general, todo fármaco es potencialmente tóxico, por lo regular por sobredosis. De ahí que el término tóxico tenga una connotación más amplia, mientras que el de veneno se restringe a sustancias que en cualquier dosis siempre causan alteración en la salud. Sin embargo, en la práctica ambas expresiones se emplean como sinónimos.

Antes del siglo XVIII, los venenos constituían un arma exclusiva de las clases privilegiadas. Por ejemplo, en Egipto, los sacerdotes eran los conocedores y depositarios de los venenos, en tanto que en la Grecia antigua el Estado asumió ese papel de depositario e hizo del envenenamiento una forma de ejecución.

En Roma, los emperadores y los patricios contaban con los servicios de envenenadores profesionales, quienes empleaban preferentemente el arsénico. Los abusos obligaron a la producción de la *Lex Cornelia*, que castigaba con pena de muerte al autor de un envenenamiento. Entre los compuestos que en esa época se usaban era el *acqua de Peruzia*, el *acqua di Napoli* y el *acqua de Toffana esta última*, contenía arsénico y cantárida, con la que se envenenaron a seiscientas personas, además de los papas Pío III y Clemente XIV.

En Francia, los médicos introdujeron esta arma sutil. Entre los envenenadores famosos puede citarse a la marquesa de Brinvilliers, ajusticiada en 1679, y a la Voisin, autora del envenenamiento de dos mil quinientos niños e involucrada en un intento de envenenar a Luis XIV.

A partir del siglo XVIII el veneno pasó a manos de las restantes clases sociales, y debido a su difusión surgió la necesidad de descubrir la presencia de tóxicos en las víctimas. Esta circunstancia impulsó el desarrollo de la toxicología como ciencia. Su propulsor fue un médico de origen español, graduado en la Universidad de París, donde llegó a ser catedrático de medicina legal a los 32 años de edad y Decano de la Facultad de Medicina: Mateo Buenaventura Orfila (1787-1853).¹⁴



ETIOLOGÍA DE LAS INTOXICACIONES.¹⁴

La forma *accidental* suele ser la más frecuente, especialmente en niños. Algunos autores la desglosan en *medicamentosa*, ocasionada por sobredosis involuntaria o por idiosincrasia; *laboral*, adquirida por exposición al tóxico durante el trabajo habitual (como el saturnismo en obreros de fábricas de baterías); *alimentaria*, por comida contaminada; *hídrica*, por aguas contaminadas, como el arsenicismo endémico en zonas donde la tierra contiene elevado porcentaje de arsénico que se difunde por medio del agua.

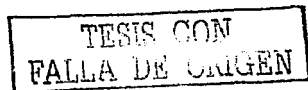
La forma suicida ha alcanzado proporciones alarmantes en algunas áreas rurales de Costa Rica, mediante la investigación voluntaria de insecticidas organofosforados y herbicidas del tipo *paraquat*.

La forma homicida es poco frecuente en la actualidad. Por lo general, el envenenador aprovecha que la víctima se encuentra en estado de ebriedad para hacerle ingerir el tóxico mezclado con alimentos sólidos o líquidos (bebidas).

En 1946, Takahara descubrió una forma de intoxicación debida a causas genéticas que, a causa de impedimento hereditario para la degradación, hace que sustancias que son inocuas para la mayoría de la población, resulten tóxicas para algunas personas que sufren ese trastorno metabólico. Así, el mencionado investigador japonés descubrió la *acatalasia*. Esta consiste en la incapacidad de ciertos individuos para degradar el agua oxigenada, que en ellos transforma a la hemoglobina en un producto negro, oxidado. Otros ejemplos son las reacciones de idiosincrasia a las habas (*favisismo*), las porfirias agudas y la intolerancia a anestésicos.

De acuerdo con su origen, los tóxicos se dividen de la siguiente forma:

- 1.- Vegetales, como los alcaloides del opio, la cocaína, la marihuana, la atropina y la nicotina.
- 2.- Minerales, como el arsénico, el plomo, el mercurio y el talio, entre otros.
- 3.- Animales, como los venenos de serpiente, la cantaridina, etc.
- 4.- Sintéticos, como los barbitúricos, psico-trópicos y plaguicidas.



CONDICIONES QUE INFLUYEN EN LAS INTOXICACIONES.

a) Dependiendo del tóxico

Como la composición química, la dosis o la solubilidad. De esta última es un ejemplo el sulfato de bario, que no es tóxico, mientras que el carbonato de bario si lo es, por ser soluble.

El mayor efecto en un órgano o tejido determinado se ha explicado mediante la *ley de la electividad*.

La mayor toxicidad conforme más breve sea el periodo de latencia, se expresa en la *ley de los tiempos*.

b) Dependiendo del individuo

Como la edad del paciente. De esto es un ejemplo la mayor susceptibilidad de los niños y los ancianos a la mayoría de los tóxicos. Una excepción la constituye el talio y la atropina, que son mejor tolerados por los niños que por los adultos.

Otras condiciones que favorecen la intoxicación son el ayuno, la desnutrición, los estados febriles y las enfermedades concomitantes.

c) Dependiendo de la administración.

De acuerdo con la vía de introducción del tóxico, se acelera su efecto. También puede influir la velocidad con que se introduzca, como es el caso de la aminofilina por inyección endovenosa, en la cual la administración rápida puede causar fibrilación ventricular.¹⁴

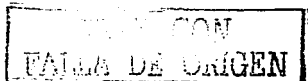
METABOLISMO DE LOS TÓXICOS.¹⁴

Se deben de considerar las siguientes etapas:

Absorción: El tóxico se pone en contacto con el organismo a través de las siguientes vías:

1.- *Cutánea:* tóxicos como los insecticidas organofosforados pueden penetrar a través de la piel íntegra. También, lo hacen las tinturas y disolventes de grasa cutánea.

2.- *Digestiva:* la mayor parte de las intoxicaciones accidentales y suicidas se deben a la ingestión del tóxico. Aparte de esta condición de puerta de entrada, hay tóxicos que, como los cianuros, se absorben en el nivel de la boca misma. El alcohol, los alcaloides y los hidrocarburos clorinados en medio oleoso lo hacen a través de la mucosa gástrica. En el intestino delgado se absorben la mayoría de los tóxicos, y en la mucosa rectal el ácido sulfhídrico.



3.- *Respiratoria*: es la puerta de entrada para gases, tóxicos volátiles, sólidos finamente divididos y líquidos atomizados.

4.- *Conjuntival*: para la atropina, la cocaína y los cianuros.

5.- *Parenteral*: en sus variedades subcutánea, intramuscular y endovenosa. Ejemplos son las flechas impregnadas de veneno en su punta, las picaduras y mordeduras de animales ponzoñosos.

Fijación y transformación: Una vez que el tóxico se ha absorbido, el organismo trata de fijarlo y transformarlo en sustancias menos tóxicas. Para ello recurre a mecanismos de *oxidación* (alcohol etílico oxidado a bióxido de carbono y agua), *reducción* (ácido pítrico a ácido picrámico), *desdoblamiento* por saponificación o hidrólisis; *conjugación o síntesis* (con el ácido sulfúrico para formar sulfoconjugados, y con el ácido glucurónico para constituir glucuronosconjugados) *metilación y desmetilación* en el nivel hepático.

La mayor parte de los tóxicos ingeridos se fijan en el hígado. Los digitálicos lo hacen en el músculo del corazón; los barbitúricos y anestésicos generales en el cerebro; el benceno en la médula ósea, etcétera.

Eliminación: finalmente el tóxico o los productos de su transformación se eliminan del organismo a través de alguna de estas vías:

1.- *Renal*: Para los tóxicos solubles, como los alcaloides y glucósidos.

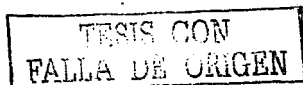
2.- *Respiratoria*: para el monóxido de carbono, anestésicos generales, balsámicos.

3.- *Intestinal*: para metales y no metales.

4.- *Salival*: para alcaloides.

5.- *Mamaria*: para alcaloides, barbitúricos, metales y no metales.

6.- *Gástrica*: para la morfina. De este modo se establece un círculo vicioso, ya que la morfina eliminada a través de la pared del estómago es nuevamente absorbida en el intestino delgado. De ahí la utilidad del lavado gástrico tardío, que aún cuando no puede neutralizar lo que se ha ingerido, puede impedir la absorción de lo que en ese nivel se está eliminando. ¹⁴



ASPECTOS QUÍMICOS DEL MONÓXIDO DE CARBONO.

Se trata de un gas incoloro, inodoro, insípido y no irritante cuando se encuentra en estado puro, pero por lo general está contaminado con impurezas que son las que poseen olor. Su formación se debe por la combustión incompleta de partículas orgánicas. El monóxido de carbono (CO) es el contaminante que más abunda en la capa inferior de la atmósfera, y un gran número de muertes accidentales y suicidios se producen cada año con su inhalación.

La concentración promedio del monóxido de carbono en la atmósfera es de 0.1 ppm; fuentes naturales como la oxidación atmosférica de metano, incendios forestales, oxidación de terpina, y el océano mismo (en el que los microorganismos producen monóxido) explican casi 90% del monóxido de carbono atmosférico; la actividad humana produce el 10% restante.

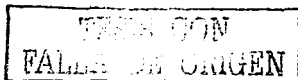
Al parecer, la concentración promedio de monóxido de carbono en la atmósfera se estabiliza por medios naturales y eficientes de eliminación ("sumideros"), el más importante de los cuales parece ser la reacción del monóxido con radicales hidroxilo del ambiente para formar dióxido de carbono; la porción superior de la atmósfera y la tierra también la hacen a veces de sumideros.

Sus cualidades venenosas se deben a su gran afinidad con la hemoglobina, ya que se tiene un poder de combinación de casi 220 veces mayor que el oxígeno. Esto quiere decir que aún en concentraciones pequeñas de monóxido de carbono son capaces de desplazar al oxígeno de los eritrocitos y de manera progresiva, disminuir la capacidad de la sangre para transportar oxígeno a los tejidos.

Aunque desde hace mucho tiempo se sabe que el monóxido de carbono es sintetizado por el organismo durante la degradación del grupo hemo, no se pensaba que poseyera una función fisiológica. Con la identificación de ácido nítrico como factor relajante derivado del endotelio, se sugirió que el monóxido podría tener una función similar.²⁰ Sin embargo, se requiere de mucha investigación para establecer si el monóxido de carbono posee alguna función fisiológica o no.

Otra fuente de contacto con el monóxido de carbono, es el humo del tabaco. Señalan una mediana del nivel de carboxihemoglobina (COHb) de 5.9% en fumadores que consumen dos cajetillas de cigarrillos al día (unos 40 cigarrillos) y que inhalan el humo.^{8,22}

En muchos países urbanizados, este gas era un importante método de suicidio hasta hace algunas décadas, debido a que formaba parte del "gas de carbón" o "gas de pueblo" y por ello se encontraba disponible en el hogar. Ya que contenía entre 7 y 20% de monóxido de carbono (CO), éste era un veneno potente que causaba muchas muertes accidentales. Cuando se generalizó el empleo del gas natural, en especial a través de Europa y Norteamérica, el efecto



venenoso del gas doméstico se redujo de manera drástica, pero en hogares donde todavía se utiliza el gas que se produce por carbón, este riesgo aún existe.

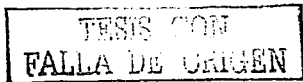
Desde el cambio de gas de uso doméstico, otras fuentes de envenenamiento por monóxido de carbono se han vuelto más prominentes. La ventilación inadecuada de hornos y automóviles ocasiona muchas muertes cada año. Casi todas las víctimas de incendios en espacios cerrados fallecen de intoxicación aguda por el gas y no por las quemaduras. El automóvil es la fuente máxima de monóxido de carbono; en zonas de tránsito intenso las concentraciones llegan a 115 ppm, en vías rápidas a 75 ppm, y en zonas residenciales a 23 ppm. En garajes y túneles subterráneos se ha advertido que los niveles de dicho gas rebasan las 100 ppm durante periodos largos.

El escape de gas de los motores de gasolina (a menos que se hayan acondicionado con convertidores catalíticos modernos) producen de 4 a 8% de monóxido de carbono, los motores de diesel tienen una producción menor. Es una forma común de suicidio, en la cual la víctima se encuentra sentada en el automóvil en una cochera cerrada con la máquina encendida o que dirige una manguera desde el escape hasta la ventana del auto.

La instalación de dispositivos para controlar la contaminación, lo que incluye convertidores catalíticos en los sistemas de escape de los automotores, ha disminuido las emisiones de monóxido de carbono por el tránsito vehicular y debe disminuir las del gas en atmósferas urbanas.

Las demás causas comunes son instalaciones y sistemas de calefacción defectuosas. Cuando se quema combustible de hidrocarburo, la mayor parte de éste se convertirá en bióxido de carbono, siempre que exista un abastecimiento adecuado de oxígeno (aire); si el aire es limitado, entonces se formará monóxido. Esto puede ocurrir con las calefacciones de agua que utilizan gas, con los calentadores de agua para bañarse, quemadores de estufa, hornos y en unidades de calefacción defectuosas que emplean como combustible carbón, coque o petróleo. El inadecuado ajuste y el bloqueo de las chimeneas y los tubos de las mismas pueden conducir a este problema. No es que el gas contenga monóxido de carbono, ya que incluso se puede emplear butano o propano, sino la combustión incompleta del combustible, en un abastecimiento inadecuado de oxígeno provoca la presencia de monóxido de carbono. Estos dispositivos defectuosos, quizá maten a familias enteras mientras duermen en una casa o en un remolque.

Otra gran fuente de monóxido, es la combustión de madera, muebles y telas durante un incendio, se llega a producir grandes volúmenes de monóxido de carbono, con otros gases tóxicos, los cuales matarán a mucha más gente que las quemaduras mismas. También, es importante considerar a las industrias que trabajan con acero.⁹



FACTORES QUE DETERMINAN LA TOXICIDAD DEL MONÓXIDO DE CARBONO.

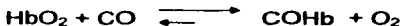
La toxicidad del monóxido de carbono depende principalmente de la concentración del gas en el aire inspirado, el tiempo de exposición, el volumen respiratorio por minuto, el gasto cardiaco, la necesidad tisular de oxígeno, y la concentración de hemoglobina en la sangre. Los anémicos son más susceptibles a la intoxicación por monóxido de carbono que las personas con cantidades normales de hemoglobina.

El metabolismo más intenso, agrava los síntomas de la intoxicación por monóxido de carbono; por esta razón, los niños mueren antes que los adultos cuando ambos se exponen a una concentración dada del gas.

Los cambios en la presión barométrica no modifican las afinidades relativas de la hemoglobina por el oxígeno y el monóxido de carbono. Sin embargo, a grandes alturas y en otras situaciones en que es pequeña la tensión de oxígeno, los efectos de una concentración particular de monóxido de carbono serán correspondientemente más intensos.⁸

REACCIÓN DEL MONÓXIDO DE CARBONO CON LA HEMOGLOBINA.

La toxicidad del monóxido de carbono proviene de su combinación con la hemoglobina para formar carboxihemoglobina (COHb). En dicha forma, la hemoglobina no transporta oxígeno, dado que ambos gases reaccionan con los mismos grupos protéticos del grupo hemo en la molécula tetramérica de la hemoglobina (Anexo 1). La afinidad de la hemoglobina por el monóxido de carbono es 220 veces mayor que por el oxígeno y, por esa causa, es peligroso incluso en bajísimas concentraciones. El aire contiene 21% de oxígeno en volumen; por tanto, la exposición a una mezcla gaseosa de 0.1% de monóxido de carbono (1 000 ppm) en el aire ocasiona una carboxihemoglobinemia cercana a 50%.⁶



La $K_{eq} = 2.1 \times 10^2$, por lo que el equilibrio se halla muy desplazado hacia la derecha. El tipo de enlace entre la Hb y el monóxido de carbono, así como el sitio de combinación, son los mismos que los del complejo Hb-Oxígeno. Es decir el monóxido de carbono se combina a la posición sexta del hierro del grupo hem por medio de un enlace coordinado.⁷

La disminución en la capacidad acarreadora de oxígeno de la sangre es proporcional a la cantidad de carboxihemoglobina presente (Fig.2). Sin embargo, disminuye todavía más el

oxígeno que llega a los tejidos, por la influencia inhibitoria de COHb en la disociación de cualquier oxihemoglobina (HbO_2) disponible; puede entenderse mejor si se compara a una persona anémica con una cifra de hemoglobina de 80g/L con otra que tenga una cifra de hemoglobina de 160g/L, pero en la que la mitad de éste se encuentre en la forma de COHb (Fig. 1). En cada caso la capacidad acarreadora de oxígeno es la misma. El individuo anémico puede mostrar síntomas leves o nulos, en tanto que la persona que sufre intoxicación por monóxido estará cercana al colapso.

La toxicidad del monóxido de carbono, depende no sólo de la interferencia en el aporte de oxígeno por la sangre; este gas ejerce también un efecto tóxico directo al unirse a citocromos celulares como los presentes en las enzimas respiratorias y la mioglobina.⁶

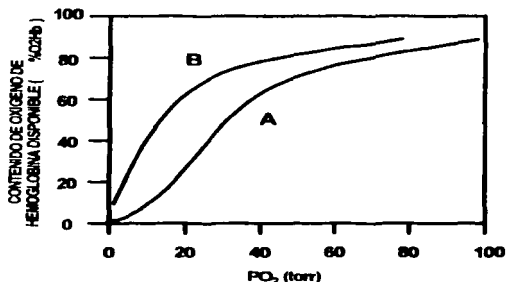
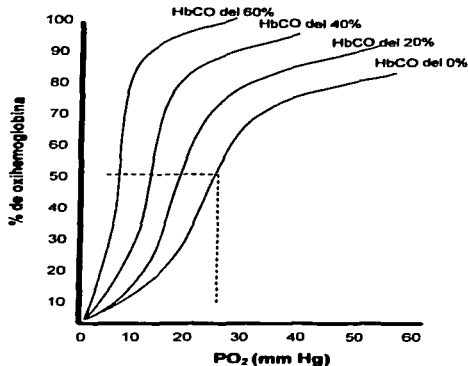


Fig. 1 Efecto de la carboxihemoglobina (COHb) en la curva de disociación de la oxihemoglobina.

La curva A representa la curva de disociación normal de oxígeno no alterada por la presencia de anemia (p. Ej. 80 g/L hemoglobina en la sangre) La curva B representa en la que hay 50% de COHb y una concentración normal hemoglobina (160 g/L de hemoglobina en la sangre y la mitad de sitios de unión ocupados por el monóxido de carbono). La capacidad acarreadora del oxígeno es igual en ambos casos; sin embargo, cuando hay COHb el oxígeno se disocia de la hemoglobina, a nivel menores de PO_2 . El efecto anterior es consecuencia de interacciones entre los sitios de unión por oxígeno o monóxido de carbono; se conocen cuatro sitios de este tipo por molécula de hemoglobina.⁷

Fig. 2 Alteración de la afinidad de la oxihemoglobina con diversas concentraciones de carboxihemoglobina (HbCO). La P_{50} normal es de 27 mm Hg. A medida que el monóxido de carbono se une a sitios potenciales de la hemoglobina para oxigenación, los sitios restantes muestran una mayor afinidad por el oxígeno, desviando la curva hacia la izquierda.¹⁷



SIGNOS Y SÍNTOMAS DE LA INTOXICACIÓN POR MONÓXIDO DE CARBONO.

Aunque hay una gran variación en la susceptibilidad de cada persona y en la velocidad en la cual se produce la saturación, es probable que valores de saturación de la carboxihemoglobina (COHb) superiores a 50 a 60% sean mortales en adultos sanos. La gente mayor y aquellos que padecen de enfermedad cardíaca o pulmonar llegan a morir con una exposición a cifras mucho más bajas, incluso hasta 25% de saturación.

Las diferencias entre la sensibilidad individual de las personas se ejemplifican de modo perfecto por la común tragedia de muertes múltiples en el mismo cuarto, donde dos cuerpos que estaban lado a lado presentan valores de saturación notablemente diferentes.

Los síntomas de envenenamiento por monóxido de carbono son lentos y progresivos, por lo cual la víctima ni siquiera nota que algo sucede, excepto que sienten un dolor de cabeza, hasta que llega al estado de coma y muere. En general en adultos de buena condición cuando llegan al 30% de saturación de la hemoglobina presentan dolor de cabeza y náuseas ligeras, con

pérdida de concentración y hasta un ligero "embriagamiento" que suele confundirse con los efectos del alcohol, en especial si las habilidades para la conducción se encuentran disminuidas.

A partir de 30 a 40% de la saturación, empiezan a presentarse náuseas, quizá vómitos, sensación de desmayo, pérdida de agudeza visual, debilidad y deslizamiento hacia estupor y coma. Sobre 40 a 50%, progresará hasta un estado de enfermedad, debilidad, falta de coordinación, convulsiones y coma hacia una insuficiencia cardiorespiratoria y muerte. Algunos adultos en buena condición física alcanzan 70% de la saturación o más antes de morir. Se debe enfatizar que estos porcentajes son muy variables, ya que dependen de la edad, estado físico y, menos evidentemente, de la susceptibilidad de la persona.

Debido a la estabilidad de la carboxihemoglobina (COHb), que continúa su acumulación mientras que la sangre absorbe el gas de los pulmones, concentraciones asombrosamente pequeñas podrían al final causar la muerte. En un periodo de 2 a 3 horas. Aún 0.1% de monóxido de carbono en la atmósfera da como resultado 55 a 60% de saturación. En 20 minutos, 1% de monóxido de carbono provoca la pérdida de la conciencia y el aire de una cochera con un motor de automóvil de dos litros encendido, alcanza valores mortales en cinco minutos.

El ejercicio que causa una respiración más acelerada y las respiraciones más rápidas de los niños apresuran la absorción de una concentración mortal de monóxido de carbono.

Los signos y síntomas de la intoxicación por monóxido de carbono son los característicos de la hipoxia. El cerebro y el corazón son los órganos con las mayores necesidades de oxígeno y el metabolismo más intenso, por lo cual, son los más sensibles a la hipoxia, y en ellos se manifiestan casi todos los efectos observados después de la exposición al tóxico. Los síntomas de intoxicación por monóxido de carbono han sido correlacionados con el contenido de COHb de la sangre, como se muestra en la Figura 3.

Es importante destacar que en una persona determinada, los signos y síntomas clínicos tal vez no guarden una correlación estrictamente cuantitativas con dicho nomograma; es más, una persona dada puede presentar todos los síntomas mencionados. Se advierte notable variación entre personas y hay poca información sobre la variabilidad interindividual, la velocidad y duración de la captación y parámetros cinéticos afines, para definir un nomograma verdaderamente exacto. No obstante, las relaciones mostradas pueden ser útiles, en un sentido semicuantitativo, para relacionar la exposición con el efecto. A veces, la inhalación de concentraciones altas de monóxido de carbono produce signos prodrómicos (debilidad y mareos transitorios) antes de perder la conciencia, pero puede no ocurrir algún signo de este tipo.

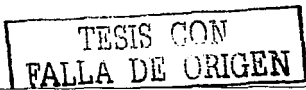
Se ha advertido un continuo de síntomas en la intoxicación por monóxido de carbono. No obstante, hay que destacar que surge enorme variabilidad interindividual en respuesta a la exposición al monóxido de carbono.

Las concentraciones moderadas de COHb tienen poco efecto en las funciones vitales del ser humano en reposo. Como se mencionó, la presencia de la carboxihemoglobina disminuye la capacidad oxífera, pero no la presión parcial ejercida por el oxígeno disuelto (PO_2) de la sangre arterial. En consecuencia, el mecanismo de quimiorreceptores carotídeo y aórtico no estimula la respiración. La frecuencia cardíaca, por otra parte, se incrementa en todos los sujetos en quienes la COHb llega a 30%, tal vez para compensar la vasodilatación periférica causada por la hipoxia; la lactacidosis es consecuencia de la hipoxia tisular.

Son muy diversos los signos clínicos en personas con intoxicación aguda por monóxido de carbono; muchos muestran síntomas que no son los típicos de este cuadro: lesiones cutáneas, sudación excesiva, hepatomegalia, tendencia hemorrágica, hiperpirexia, leucocitosis, albuminuria y glucosuria.

Como se comentó, los tejidos más afectados por la exposición al monóxido de carbono son los más sensibles a la privación del oxígeno, como el encéfalo y el corazón, y las lesiones son predominantemente hemorrágicas. Puede ocurrir daño permanente del corazón por la presencia de COHb en la sangre; a veces se observan signos de cambios isquémicos y de infarto subendocárdico. Se considera que la cefalalgia intensa consecutiva a exposición al monóxido de carbono se debe a edema cerebral e hipertensión intracraneal, que es resultado del trasudado excesivo por capilares hipóxicos. Finck ²¹ ha catalogado los cambios patológicos microscópicos observados en 351 casos mortales de intoxicación accidental por monóxido de carbono; los casos prontamente mortales se caracterizaron por congestión y hemorragia de todos los órganos. En situaciones más prolongadas que culminaron finalmente en la muerte, las lesiones hipóxicas observadas dependieron de la duración de la inconsciencia poshipóxica.

Bokonic ¹⁹ demostró que el período máximo de inconsciencia poshipóxica inducida por monóxido de carbono compatible con recuperación neurológica completa es de 21h en personas menores de 48 años y de 11h en sujetos de mayor edad. No se observó recuperación completa de las funciones mentales cuando la inconsciencia rebasó las 15h en un grupo de personas ancianas o las 64h en un grupo de individuos jóvenes. Es probable que el efecto más insidioso de la intoxicación por monóxido de carbono sea la aparición tardía de trastornos neuropsiquiátricos, que se manifiestan por euforia y perturbaciones del juicio, del pensamiento abstracto y de la concentración, algunos clínicos piensan que niveles de monóxido demasiado bajos para inducir coma también pueden ocasionar efectos neuropsiquiátricos. ^{8,20}



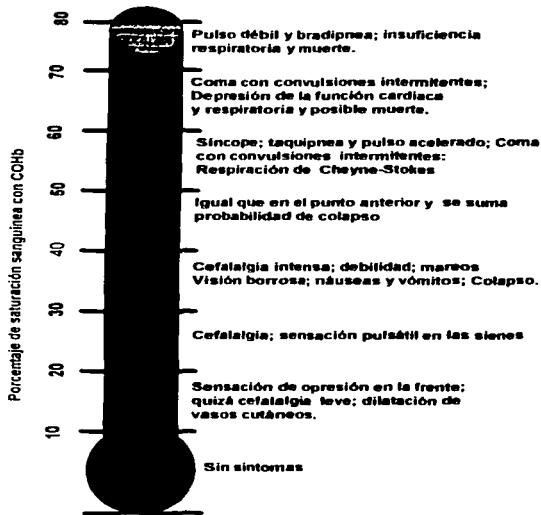


Fig. 3. Correlación entre la concentración de carboxihemoglobina y signos y síntomas de intoxicación por monóxido de carbono. No obstante, hay que destacar que surge enorme variabilidad interindividual en respuesta a la exposición al monóxido de carbono. Debe utilizarse el nivel sanguíneo de carboxihemoglobina (COHb) solo como una forma semicuantitativa para relacionar la exposición con el efecto.³³

La intoxicación profunda por monóxido de carbono produce lesiones cutáneas que varían desde áreas de eritema y edema hasta la formación de vesículas y bolas muy notorias. También, se observa a veces rabdomiólisis, tal vez causada por el efecto tóxico directo del monóxido de carbono en la mioglobina y la mioglobinuria, con insuficiencia renal

Los signos de envenenamiento por monóxido, además de los síntomas, son una coloración rosada de la piel, a la que por lo general se le conoce como "piel rosa cereza".

Las uñas y los labios también llegan a mostrar el color típico, pero es posible que no sea tan obvio en los vivos hasta que alcanza un valor de saturación elevado. En las áreas hipostáticas de un cuerpo sin vida, por lo general esto es evidente, pero una excepción son los ancianos y

anémicos, en quienes una disminución del contenido de hemoglobina reduce la intensidad de la coloración.

Internamente, todos los órganos presentan un color rosado debido a la carboxihemoglobina y a la mioglobina. El edema pulmonar es común, aunque no hay cambios orgánicos específicos, excepto en el cerebro; los sobrevivientes al envenenamiento por monóxido de carbono presentan una degeneración quística bilateral de los ganglios basales en conjunto con un síndrome parkinsoniano o hasta un peor estado neurológico. También, hay un daño psicológico a largo plazo después de la profunda hipoxia cerebral del envenenamiento por monóxido de carbono.⁹

DIAGNÓSTICO DE LA INTOXICACIÓN POR MONÓXIDO DE CARBONO.

El diagnóstico preliminar de la intoxicación aguda por monóxido de carbono suele ser facilitado por pruebas circunstanciales, dado que la víctima suele estar en situaciones que dejan poca duda respecto a la causa del problema. La COHb tiene color rojo cereza y su presencia en altas concentraciones en la sangre capilar puede impartir un color rojo anormal a la piel, mucosas y los lechos ungueales. Sin embargo, el individuo vivo suele estar más cianótico y pálido, y sólo en la necropsia se advierte la "cianosis rojo cereza".

El diagnóstico definitivo, depende de la demostración de carboxihemoglobina en la sangre. En la persona fuertemente intoxicada no ha de retrasarse el tratamiento por realizar dicha prueba, pero la demostración de la carboxihemoglobina (COHb) es de importancia forense. Si una persona muere en un atmósfera que contiene monóxido de carbono, la muestra sanguínea post mortem suele contener 60% de carboxihemoglobina; sin embargo, algunas mueren en un medio con concentraciones menores. Si la persona es retirada de dicha atmósfera mientras respira, aún disminuirá rápidamente la concentración de COHb, y si el intercambio respiratorio sigue siendo adecuado, esta forma de hemoglobina desaparecerá de la sangre en un lapso de horas.^{7,9}

DESTINO Y ELIMINACIÓN DEL MONÓXIDO DE CARBONO.

La COHb es totalmente disociable, y una vez concluida la exposición aguda, el monóxido de carbono se excretará por los pulmones y sólo una cantidad pequeñísima de él se oxidará en dióxido de carbono.



El monóxido de carbono (CO) no se excreta sin respiración activa. Es más, la carboxihemoglobina es extraordinariamente estable y casi no la afecta la putrefacción. Por tanto, mucho tiempo después de la muerte de una persona se pueden hacer mediciones válidas de las concentraciones de COHb en el cuerpo. Por el contrario, después de la muerte el monóxido de carbono se absorbe poco o nada y el análisis de sangre del corazón permite hacer una medición precisa de la concentración sanguínea de COHb al morir el sujeto. Estos datos son de interés medico legal.

Si la persona en reposo inspira aire del ambiente, el contenido de monóxido de carbono en su sangre disminuirá, con una vida media de 320 min. Si el aire se sustituye por oxígeno puro (100%), la cifra disminuirá en 80 min; en un medio hiperbárico la vida media puede ser menor de 25 min. ²⁸ Estos hechos, aportan los principios básicos para el tratamiento de la intoxicación por monóxido de carbono. ⁶

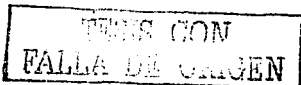
INTOXICACIÓN POR EXPOSICIÓN PROLONGADA A BAJAS CONCENTRACIONES DE MONÓXIDO DE CARBONO.

El aparato cardiovascular, en particular el corazón, es susceptible a los efectos adversos de bajas concentraciones de carboxihemoglobina. Con niveles de 6 a 12% de ella, el metabolismo cambia de aerobio a anaerobio. ¹⁸

Los estudios experimentales y clínicos sugieren que la exposición a largo plazo al monóxido facilita la aparición de aterosclerosis. ³⁰ El monóxido de carbono también parece afectar la conducta humana. La realización de pruebas de vigilancia se altera cuando la COHb llega incluso a 2 a 5 %. No obstante, estos niveles bajos de COHb tal vez no tengan efecto en otras conductas, como la de conducción de vehículos, tiempo de reacción, discriminación temporal, coordinación, procesos sensoriales y tareas intelectuales complejas. ³²

El feto puede ser extraordinariamente susceptible a los efectos del monóxido de carbono, el cual cruza fácilmente la placenta. Los hijos de mujeres que han sobrevivido a la exposición breve a una concentración alta del gas durante el embarazo, suelen mostrar secuelas neurológicas y pueden sufrir lesión cerebral grave. ²³ Los niveles persistentemente bajos de COHb en el feto de una mujer que ha fumado durante el embarazo; también puede influir en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC).

La policitemia, surge en el curso de la exposición a largo plazo al monóxido de carbono. Es probable que aparezcan otros mecanismos compensatorios, aunque no se han demostrado. Los sujetos sanos son extraordinariamente reactivos al estrés de la hipoxia, y la compensan de



inmediato, por incremento del gasto cardiaco y el flujo a órganos de máxima importancia. Los individuos con enfermedad cardiovascular significativa son más vulnerables a la intoxicación por monóxido de carbono, porque tal vez no puedan hacer compensaciones de la hipoxia.³⁴

Debido a que el área de superficie es grande, la absorción en el epitelio pulmonar y las mucosas de las vías respiratorias llega pronto a la circulación, lo que provoca la intoxicación en muy poco tiempo.⁶

TRATAMIENTO DE LA INTOXICACIÓN POR MONÓXIDO DE CARBONO.

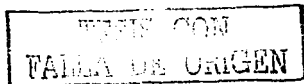
En primer término resulta esencial llevar a la víctima a un medio con aire fresco. Si ya no respira, habrá que emprender inmediatamente respiración artificial. Hecho lo anterior, el tratamiento se orienta a suministrar cantidades adecuadas de oxígeno a las células corporales y apresurar la eliminación del monóxido de carbono. Casi siempre bastará la administración rápida de oxígeno puro con una mascarilla perfectamente ajustada.

Algunos clínicos recomiendan dar oxígeno hiperbárico cuando se cuenta con el equipo necesario. Lo racional (aunque no se ha corroborado inequívocamente) de el método es que el oxígeno hiperbárico, además de aportar dicho gas en solución para los tejidos, también apresura la disociación de COHb. La mejor guía de normalización de la saturación apropiada del oxígeno es la función neurológica de la víctima; es posible medir las concentraciones sanguíneas de carboxihemoglobina con el CO-oxímetro como dato de apoyo, para evaluar la eficacia de la oxigenación, y los niveles sanguíneos decrecientes de COHb a menos de 10 % de la saturación constituye un punto de corte terapéutico razonable (Anexo 2). Las medidas suplementarias incluyen corrección de la hipotensión y la acidosis, así como vigilancia seriada de la función cardiaca.¹³

INVESTIGACIÓN TOXICOLÓGICA.

La investigación toxicológica es el conjunto de procesos analíticos que tienen por objeto el aislamiento, identificación y determinación cuantitativa de los tóxicos, tanto en el vivo como en el cadáver, con el fin de permitir el diagnóstico y el esclarecimiento de los hechos.

En sus orígenes la toxicología forense fue fundamentalmente analítica y su campo de acción, el cadáver; en la actualidad las funciones de esta rama de la toxicología son mucho más



extensas, proyectándose sobre el vivo, sobre el cadáver, sobre la actividad laboral y sobre el medio ambiente.

El toxicólogo forense tiene dos tipos de necesidades en su metodología:

1.- Test generales. Deben ser sensibles, aunque no necesariamente específicos, y detectar un gran número de sustancias, de modo que los resultados negativos permitan centrar la atención en unos pocos grupos. En este caso un resultado negativo es de gran valor para descartar la presencia de un determinado grupo de sustancias. Estos test pueden ser muy variados de acuerdo con el equipamiento, personal, volumen de trabajo, etc.

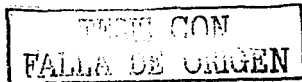
2.- Métodos cuantitativos fiables. Una vez que se sospecha la presencia de una sustancia por los test anteriores, ésta debe confirmarse al menos por dos técnicas independientes. Los resultados cuantitativos deben ser consistentes, lo que significa: evitar al máximo las interferencias y conocer la precisión y exactitud del método utilizado. La necesidad de un resultado cuantitativamente riguroso y exacto es lo que caracteriza los análisis en toxicología, a diferencia de la toxicología clínica, donde no se requiere tal precisión.

El tiempo aproximado de análisis, se define como el intervalo entre la llegada de la muestra al laboratorio y el máximo tiempo en que se puede ofrecer el resultado analítico. En toxicología forense, rara vez se requiere un resultado inmediato, lo que permite al analista emplear el tiempo necesario para realizar su investigación.

Sólo en casos excepcionales, como, por ejemplo, una supuesta muerte por monóxido de carbono en una habitación, se exigiría un análisis inmediato para evitar más accidentes por aquella causa.

Desde el momento en que un tóxico penetra en el organismo, recorre forzosamente un camino más o menos intrincado hasta alcanzar los lugares donde va a actuar y acabar finalmente por ser eliminado.

Este devenir del tóxico está representado por los procesos de:



Cada uno de estos procesos contribuye en parte a la toxicidad del compuesto en cuestión y puede también en alguna medida, tener consecuencias analíticas importantes.

En principio, el desarrollo de un método específico va a depender del conocimiento de la metabolización y de las propiedades de los metabolitos del tóxico.

La selección de las muestras adecuadas para el análisis y su correcta conservación son requisitos indispensables en una investigación toxicológica.

Las muestras para un análisis toxicológico, deben recogerse teniendo en cuenta las condiciones particulares de cada caso.

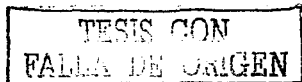
En nuestro caso, la sangre es una de las muestras de mayor utilidad para la identificación del tóxico y especialmente para el análisis cuantitativo.

La sangre se utiliza normalmente para el screening de tóxicos ácidos y neutros, cuyas concentraciones en caso de intoxicación son elevadas, así como para el estudio de gases y sustancias volátiles, siempre que se conserven en recipientes cerrados herméticamente.

También, debe tomarse en cuenta el hecho de la distribución del tóxico en la sangre. Normalmente los tóxicos se distribuyen entre los eritrocitos y el plasma en proporción variable para cada sustancia. La mayor parte de los tóxicos orgánicos van disueltos en el plasma o unidos a proteínas, mientras que son pocos los que se transportan unidos a los hematíes. Por ello, la sangre total y el plasma son las muestras más representativas. Al usar sangre total nos aseguramos de que tanto los tóxicos que se concentran en los eritrocitos como los que se unen a las proteínas van a estar presentes en la muestra analizada.

Las muestras de sangre post mortem están a menudo hemolizadas y putrefactas, pero son las únicas disponibles. En estos casos puede dejarse la muestra en reposo y utilizar cualquier porción de la misma próxima a la superficie, ya que será rica en plasma.

En general, es mejor agitar la muestra vigorosamente para conseguir una mezcla homogénea, antes de tomar una porción para el análisis. Para romper o disolver los coágulos, puede aplicarse un tratamiento con ultrasonido (15-20 seg).



TÉCNICAS ANALÍTICAS.

La confirmación de envenenamiento por monóxido de carbono tanto en vivos como en muertos, depende de un análisis de sangre. De los muchos métodos que existen, los más útiles son los ópticos o los químicos. La detección óptica depende de que dos bandas de absorción en el espectro de la carboxihemoglobina se encuentren en el segmento amarillo-verdoso, aunque más cercanas a la violeta que en la oxihemoglobina.

La distancia por la cual se encuentran desplazadas es una medida de la saturación cuando se examina una muestra de oxihemoglobina y carboxihemoglobina con espectroscopio. El espectroscopio de Hartridge de reversión se utilizaba de manera muy amplia como método de medición pero no es preciso en 10%, aunque por lo general, es bastante bueno para el diagnóstico. Los métodos químicos dependen de la cromatografía gaseosa o de la liberación de monóxido de carbono por cloruro de paladio.⁹

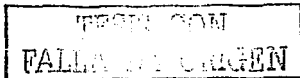
1) CUALITATIVAS

A) MICRODIFUSIÓN *

La microdifusión permite el aislamiento y la detección de los tóxicos volátiles de forma rápida y fácil. El dispositivo más usado es la cámara de Conway (Fig.4), que consiste en dos placas de Petri concéntricas, con una base común. La muestra se sitúa en el compartimiento exterior y el absorbente o disolvente, según los casos, en el interior. Después se cierra herméticamente con una tapadera de vidrio, en el borde esmeritado se aplica una fina película de silicona, o grasa similar, para asegurar un perfecto cierre.

Cualquier sustancia volátil en la muestra se distribuye entre los líquidos presentes y la cámara de aire que queda dentro de la célula. Si el vapor es más soluble en la solución del compartimiento interior, se disolverá y concentrará en dicha solución. Dejando transcurrir el tiempo adecuado; todo el tóxico volátil habrá pasado de la muestra contenida en el compartimiento exterior a la solución "captadora" dispuesta en el pocillo central. A veces se puede adicionar un ácido o una base para favorecer la liberación del tóxico de la muestra.

Las determinaciones hechas con esta técnica requieren normalmente 1 mL de muestra e incluso pueden utilizarse muestras menores con dispositivos más reducidos. El análisis por microdifusión elimina la necesidad de hacer una destilación, con el consiguiente ahorro de tiempo y personal. Además, se obtiene un producto concentrado, no habiendo necesidad de concentrar, como ocurre en el caso de la destilación, si se quiere hacer un buen análisis. Adicionalmente, con esta técnica se pueden procesar varias muestras a la vez.



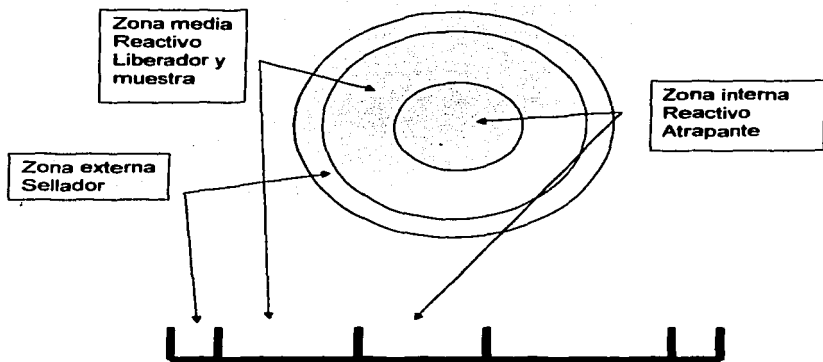


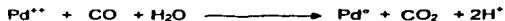
Fig.4. Dibujo de la cámara de Conway, para llevar acabo la microdifusión.

Procedimiento para la microdifusión:

Mezclar 1 mL de sangre con 1 mL de ácido sulfúrico al 10% (v/v) en la cámara de Conway en la parte exterior y en el centro se agrega 1 mL de cloruro de paladio al 0.1% (w/v) en una solución de ácido clorhídrico 0.01 N.

Se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos. La presencia de carboxihemoglobina es observada por una película plateada en la parte exterior de la celda. Lo que nos indica que es positiva. Esta prueba detecta aproximadamente el 10% de carboxihemoglobina.

La reacción que se lleva acabo es la siguiente:



B) TEST PARA MONÓXIDO DE CARBONO – CARBOXIHEMOGLOBINA. ³⁶

Se trata de una prueba sencilla que permite reconocer la transformación de la Hb a la COHb. Se toman dos tubos de ensayo de 15 x 1.6 cm se rotulan como "problema" y "control". Se les adicionan 15 mL de solución de amoniaco al 0.4 % V/V a cada uno.

Al tubo problema se le añaden 0.05 mL de sangre del intoxicado o del cadáver, recogida con anticoagulante, se mezcla por inversión. Al tubo control se le adiciona 0.05 mL de sangre normal bien oxigenada y se mezcla.

Si se encuentra 25% o más de carboxihemoglobina, en el tubo problema este mostrara un color cereza muy claro, característico cuando se observa contra un fondo blanco, en contraste con el color rojo parduzco que muestra el control.

C) SANGRE DILUIDA. ³⁷

Se coloca en un matraz 1 mL de sangre y se le adicionan 50 mL de agua, se agita y se observa. Si la disolución se observa de rosa a roja azulada nos indicara la presencia de carboxihemoglobina y si la coloración es de roja a amarillenta nos indica la presencia de oxihemoglobina (HbO₂).

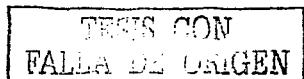
D) PRUEBA CON HIDROXIDO DE SODIO. ³⁸

Se coloca en un vidrio de reloj unas gotas de sangre y se le adicionan unas gotas de hidróxido de sodio (NaOH al 40%) , se calienta suavemente.

Si esta presente la carboxihemoglobina aparece un color rojo, mientras que si esta ausente la coloración será negro-parduzco.

E) PRUEBA CON ÁCIDO TÁNICO. ³⁹

Se colocan en un tubo de ensayo 1 mL de sangre y 4 mL de agua se agita y se le adicionan 3 ml de ácido tánico al 1% (1g/dL) y se mezcla. La presencia de carboxihemoglobina produce un precipitado rojo, mientras que la oxihemoglobina produce un precipitado marrón grisáceo.



F) PRUEBA DE KATAYAMA.³⁷

Con esta sencilla prueba se identifica la carboxihemoglobina desde un 10 %.

Se colocan 10mL de agua en un tubo de ensayo y se le agregan 5 gotas de sangre problema, en otro tubo se hace lo mismo pero se le agregan 5 gotas de sangre oxigenada la cuál nos servirá como control, se mezcla suavemente y se acidifica ligeramente con ácido acético. El color de la sangre que contiene carboxihemoglobina toma un color rojo-rosado según la concentración, mientras que la sangre normal toma un color verdoso sucio.

G) REACCION CON FERROCIANURO DE POTASIO.³⁹

Se identifican 2 tubos de ensayo uno como control y otro como problema y se adicionan muestra de sangre diluida 1:5 (control y problema).

En otro tubo se colocan 5 mL de solución de ferrocianuro de potasio al 2 % y 1 mL de ácido acético 1:3.

Al tubo que contiene la sangre se le adiciona el tubo de reactivos y se observa. La prueba se considera positiva cuando el tubo que contiene la muestra problema adquiere una coloración rojo escarlata, con una baja densidad por la falta de coagulación. Y en el control la coloración es café por lo que sería una prueba negativa.

H) REACCION CON HEMATIZANTES O METAHEMOGLOBINIZANTES.³⁹

En este tipo de reacciones se trata la sangre con agentes hematizantes o metahemoglobinizantes; la reacción se lleva a cabo en un vidrio de reloj. Se colocan unas gotas de sangre diluida y se añade el reactivo.

Reactivos:

Agua destilada

Puede utilizarse alguno de los siguientes:

Reactivo de Hoppe-Seyler (hidróxido de sodio de densidad 1:3)

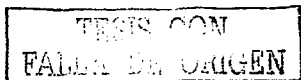
Reactivo de Kunkel (solución de tanino al 1%)

Reactivo de Stockis (solución de cloruro de zinc al 10%)

Reactivo de Liebmman (solución de formol al 10%)

Reactivo de Coronedi (se mezclan en el momento 3 mL de una solución saturada en frío de sulfato de hidracina y 1 mL de acetato sódico al 10%).

Cuando la muestra contiene carboxihemoglobina no cambia de color y cuando no esta presente cambia a un color pardo achocolatado y a veces se forman grumos.



2) CUANTITATIVAS.

1) DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE MONÓXIDO DE CARBONO EN SANGRE. ¹¹

La determinación espectrofotométrica del monóxido de carbono en sangre fue descrita por primera vez por Hufner en 1900; es una técnica sencilla, rápida y fidedigna. El fundamento de esta técnica radica en la observación de que las gráficas de absorbancia espectral de la oxihemoglobina y carboxihemoglobina son diferentes (Fig. 5). Hufner midió la diferencia de absorbancias entre las dos formas de hemoglobina a longitudes de onda de 541 y 560 $m\mu$, y aprovechó estas diferencias de absorbancia para determinar la oxi y la carboxihemoglobina. Las modificaciones desde entonces introducidas son fundamentalmente de dos tipos: a) empleo de longitudes de onda distinta de las 541 y 569 $m\mu$ indicadas en principio por Hufner, y b) la suma algebraica de los coeficientes de extinción obtenidos con más de dos longitudes de onda en la forma indicada por Drabkin.

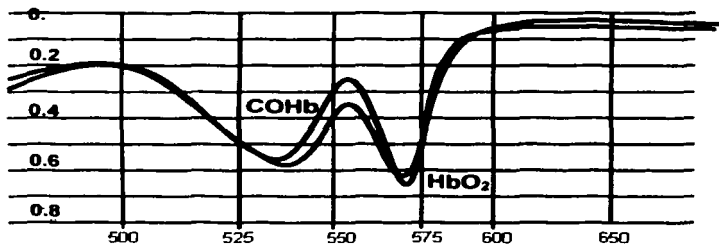


Fig. 5 Gráficas de los espectros de absorción de la carboxihemoglobina y oxihemoglobina. En ordenadas, figura la absorbancia; en abscisas, su longitud de onda. ¹¹

Procedimiento:

Se toma 20.0 μ L de sangre y se vierten en un tubo de ensayo de 10 mL que contenga 4.0 mL de amoníaco 0,007 N. Inviértase el tubo tres veces. Una parte de esta solución se coloca en una cubeta de 1.00 cm. se lee inmediatamente la absorbancia en las longitudes de onda 575, 560 y 498 $m\mu$, tomando la solución de amoníaco 0,007 N como el blanco de referencia.

Los patrones de HbO y HbCO son tratados de forma idéntica a la descrita para la muestra problema.

Reactivos:

1.- Amoniaco 0,007 N. Dilúyanse 0,48 mL de amoniaco concentrado al 28% con agua hasta 1000 mL.

Nota: La concentración de esta solución alcalina no es de importancia crítica. Harboe ha demostrado que el ritmo de formación de hematina alcalina aumenta con el incremento de la alcalinidad. A fin de evitar la formación de hematina alcalina es por lo que se emplea una solución diluida de amoniaco.

2.- Patrones de HbO₂ y COHb. Se puede emplear sangre recogida con los anticoagulantes corrientes (EDTA, oxalato).

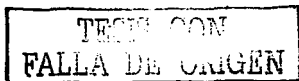
Se deben emplear en estos patrones sangre de individuos no fumadores, ya que la sangre de los fumadores puede presentar un 7% de la hemoglobina en forma de carboxihemoglobina. A ser posible, se satura una parte de la mezcla con oxígeno (O₂) o con aire. Para ello se colocan 5 mL de sangre en un embudo de decantación de 125 mL lleno de oxígeno o de aire y se le hace girar con suavidad durante 15 min. Se toman otros 5 mL y se saturan de igual forma con monóxido de carbono, procedente del gas comercial o añadiendo ácido sulfúrico sobre ácido fórmico en caliente.

Nota: El comprobador señala la necesidad de seguir exactamente las instrucciones anteriores, tales como la de emplear 5 mL de sangre. También prefiere emplear una mezcla de sangre antes de proceder a preparar los patrones de HbO₂ y COHb.

Material:

Para obtener la precisión en la lectura de los máximos de absorción espectral es conveniente disponer de un espectrofotómetro cuya escala aprecie diferencias de 5m μ o menos. Los autores han aplicado este método al espectrofotómetro registrador Perkin-Elmer 4000 A y al Beckman modelo B. Las relaciones de absorbancias obtenidas con soluciones patrones difieren ligeramente debido a la mejor resolución del primero. Por tanto, se debe tener en cuenta que cada espectrofotómetro precisa una normalización previa.

Se puede modificar la dilución para ajustarla al paso de luz de las cubetas de que se disponga. Con las diluciones empleadas en este procedimiento, las cubetas de 1,0 cm. resultan adecuadas.



Curva estándar:

Determinese la curva de absorbancia espectral del instrumento a emplear, especialmente alrededor de 575, 560 y 498, con objeto de seleccionar el punto isosbético próximo a 498, y los de máxima diferenciación alrededor de 575 y 560, a fin de poderlos ajustar exactamente en el espectrofotómetro.

En caso que así se desee, se puede comprobar las correspondencias lineales entre las relaciones de absorbancia y la concentración de carboxihemoglobina, mezclando cantidades adecuadas de los dos patrones y analizando estas mezclas en el espectrofotómetro. Así, p. Ej. Una mezcla que contenga 1,00 mL de patrón de COHb y 4,00 mL de patrón de HbO₂ debe proporcionar una relación equivalente al 20%. De igual forma se pueden preparar mezclas que contengan 40, 60 y 80% de patrón de COHb para analizarlas.

Cálculos:

Una vez medidas las absorbancias (A575, A560, A498) se calcula la carboxihemoglobina del modo siguiente:

1. Relación para el patrón de HbO₂

$$RO_2 = \frac{A575 - A560}{A498}$$

2. Relación para el patrón COHb:

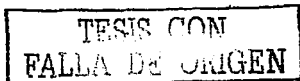
$$RCO = \frac{A575 - A560}{A498}$$

3. Relación para el problema:

$$Rx = \frac{A575 - A560}{A498}$$

- 4.- Porcentaje de COHb:

$$\frac{RO_2 - Rx}{RO_2 - RCO} \times 100$$



Este procedimiento es rápido y sencillo. Con la excepción del espectrofotómetro, se requiere un mínimo de material y reactivos. Estas condiciones lo hacen apropiado para una determinación que no es requerida diariamente en el laboratorio y que con mayor frecuencia constituye un procedimiento de emergencia. En los pacientes con anemias graves se recomienda emplear 40 µL en lugar de 20 µL a fin de obtener una exactitud óptima.

En pacientes en los que la muerte ha sido atribuida al monóxido de carbono por la historia clínica y por la autopsia se encontraron valores de COHb del 50 al 87 %.

J) MÉTODO EXPERIMENTAL CON SANGRE TERMO COAGULADA ²⁶

Se colocan 2 mL de sangre problema en un tubo de 10 mm de diámetro, se tapan con papel parafilm y se calientan gradualmente de 37 a 80 °C en un baño de agua de 1 – 13 minutos. El calentamiento es medido por un termómetro termistor. La muestra se trabaja por duplicado. Se le agregan 2 mL de solución salina a la sangre termo coagulada y se centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante de una de las muestras es utilizado para el análisis de COHb, MetHb y hemoglobina total en un sistema de CO-oxímetro.

La segunda muestra es analizada por cromatografía de gases bajo las siguientes condiciones. A la muestra se le adiciona una solución de ferrocianuro de potasio. El monóxido de carbono es determinado usando metano como estándar interno, con un detector de conductividad termal (TCD), una columna de vidrio 2.1 m x 3mm de diámetro interno, empacada con Sieres SA (malla 60-80), la temperatura de la columna es de 100°C, y la temperatura de inyección es de 110 °C; como gas acarreador helio, con un flujo de 24 mL /min, y un analizador de datos.

Para los cálculos se propone la siguiente fórmula:

$$Y = tHb \cdot X/8$$

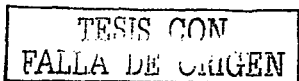
En donde:

X = % COHb utilizando el CO-oxímetro

Y = % COHb utilizando cromatografía de gases

tHb = Hemoglobina soluble total g/dL en el extracto.*

*La hemoglobina total puede ser determinada por un método colorimétrico para hierro. Como el que se menciona a continuación.³⁷



El % de COHb determinado por el método del CO-oxímetro (X) fue despreciable al % de COHb determinado por medio de cromatografía de gases (Y).

El hierro se separa de la hemoglobina con hipoclorito y se determina directamente con un reactivo sensible al color. Sólo se emplea una pequeña cantidad de sangre y se añade un tensoactivo para eliminar cualquier turbidez causada por las pequeñas cantidades de proteínas presentes.

Procedimiento:

En una serie de tubos de ensayo (de preferencia de plástico desechable) se coloca 1 ml de disolución de hipoclorito y 1 ml de disolución de Brij-35. Añadir a todos los tubos muestras de 20 μ L de sangre total bien mezclada, reservando uno de los tubos como blanco de reactivos.

Para eliminar las dificultades en el pipeteo de las muestras de sangre total, se puede utilizar el siguiente método. Se toman 5 mL de sangre. Se centrifuga y se elimina el plasma. Se lava un vez con solución salina. A las células lavadas empaquetadas se les añade 1.5 mL de agua y 0.5 mL de tetracloruro de carbono. Se sacude vigorosamente y luego se centrifuga a alta velocidad. Se separa el sobrenadante y se usa para la determinación.

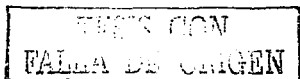
Se dejan los tubos en reposo durante 10 minutos, a continuación se añaden 3 mL de tampón y 1 mL de reactivo de color ferrozina a cada tubo. Se mezcla y se dejan en reposo durante 20 minutos, y a continuación se leen el patrón y las muestras frente a un blanco a 568 nm.

Cálculo:

Absorbancia de la muestra X Concentración del patrón = g/dL de hemoglobina en la muestra.
Absorbancia del patrón

K) MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A HEAD SPACE-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.³⁰

El procedimiento consiste en la preparación de las muestras; en un vial se coloca la muestra de sangre, en otro vial para la estimación de hemoglobina se le adiciona n-octanol, ferrocianuro de potasio y un estándar interno (1-butanol). Se separa por cromatografía de gases y se determina el monóxido de carbono usando un sistema equipado GC-MS con head space.



Para la cromatografía se emplea una columna DB-624 de 60 m x 0.32 mm de diámetro interno, la temperatura de calentamiento de la columna es de 40-65°C (30°C/min) durante 4 min, y posteriormente a 80 °C (30°C /min), la temperatura de inyección es a 150 °C, el gas acarreador es helio, con flujo de 28 cm/s, la temperatura de interfase es 230 °C, y se utiliza un detector para monóxido de carbono.

Se toman 2 muestras de sangre de aproximadamente 1 g cada una y se colocan en viales que son etiquetados como A y B respectivamente.

Al vial B (muestra de referencia) se le adiciona 0.2 mL de hidrosulfito al 20% (w/w), y 0.5 mL de ferrocianuro de potasio al 20 % (w/w), libres de CO para lo cuál se utiliza gas nitrógeno para eliminarlo.

Tanto al vial A como al B, se les adiciona 1 mL de estándar interno que consiste en una solución de t-butanol (0.5 mg/mL) y se procede a realizar la cromatografía.

La hemoglobina (Hb) y COHb contenida en las muestras se estiman utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Hb (g)} = \text{total CO } (\mu\text{l}) \text{ vial B} \times 13.9$$

$$\text{COHb (\%)} = \text{CO área del pico (vial A/vial B)} \times 100$$

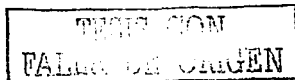
L) MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO. 4

Este método parte de que la sangre normal contiene varias formas de hemoglobina, la reducida, la oxigenada y una pequeña cantidad de metahemoglobina.

Cuando se adiciona un agente reductor como el ditionato de sodio, la forma oxigenada y la metahemoglobina son reducidas por lo que no afectan en la determinación de la carboxihemoglobina. Su espectro se observa en la curva marcada con la letra B, Fig. 6

El monóxido de carbono debido a su gran afinidad por la hemoglobina tiende a intercambiarse por el oxígeno.

La carboxihemoglobina no es reducida por el ditionato de sodio. De esta manera, el espectro normal esta marcada con la letra A. La longitud de onda de máxima absorbancia es de 540 nm y 579 nm que es el punto isobéptico.



El porcentaje de saturación de monóxido de carbono de una muestra de sangre se calcula leyendo la muestra saturada de monóxido de carbono (A), muestra libre de monóxido de carbono (B) y la muestra tratada con ditionato de sodio (C).

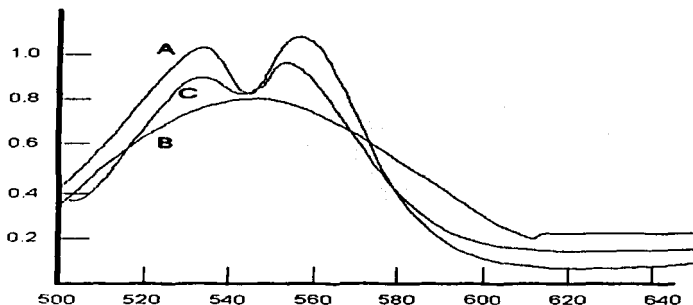


FIG. 6 Espectro ultravioleta (A) carboxihemoglobina, (B) hemoglobina reducida y (C) muestra de sangre de un paciente expuesto a monóxido de carbono.⁴

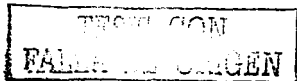
Método:

Diluir 0.2 mL de sangre (mezclar bien) con 25 mL de una solución 0.1% de amoníaco, dividirla en 3 partes iguales. Se etiquetan como A, B y C.

Saturar la solución A con monóxido de carbono burbujeado y la solución B con oxígeno puro por 10 min. Para desplazar al monóxido de carbono.

Adicionar una pequeña cantidad de ditionato de sodio a cada una de las muestras, agregar 10 mL de solución 0.1 % de amoníaco y mezclar bien.

Hacer un barrido de 500 a 650 nm con solución de amoníaco. Leer la absorbancia de la solución a 540 y 579 nm y calcular la proporción de monóxido de carbono de cada muestra.



El porcentaje de COHb-saturación es calculado de la siguiente forma:

$$\% \text{ saturación} = \frac{\text{razón C} - \text{razón B}}{\text{razón A} - \text{razón B}} \times 100$$

En donde: razón C: Proporción de CO en la muestra C

razón B: Proporción de CO en la muestra B

razón A: Proporción de CO en la muestra A

M) MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE HEILMEYER.³⁹

Esta cuantificación se basa en la localización distinta que presentan los máximos y mínimos de absorción de las dos bandas correspondientes a los espectros de absorción de la oxihemoglobina y la carboxihemoglobina. Realizando dos lecturas correspondientes a un máximo y un mínimo y calculando el cociente se obtienen valores que siguen con mucha exactitud las diferencias de los correspondientes coeficientes de intoxicación.

Estas lecturas deben realizarse a 576 y 560 nm. El valor del cociente de estas absorbancias indican directamente el porcentaje de carboxihemoglobina en sangre.

Procedimiento:

Se toman 0.5 mL de muestra problema y se diluyen con 2.475 mL de la solución de amoníaco D=880 (0.4%V/V), se agita para favorecer la hemólisis.

Se leen las absorbancias a 576 y 560 nm utilizando como blanco la solución de amoníaco.

Se calcula el coeficiente A 576/560 y el valor del coeficiente obtenido se busca en la siguiente tabla.

Esta técnica es semicuantitativa.

VALOR DE COCIENTE A 576/ A560	% DE COHb	% DE O2Hb
1.725	0	100
1.666	5	95
1.611	10	90
1.558	15	85
1.507	20	80
1.457	25	75
1.410	30	70
1.363	35	65
1.318	40	60
1.275	45	55
1.233	50	50
1.190	55	45
1.153	60	40
1.115	65	35
1.078	70	30
1.042	75	25
1.007	80	20
0.974	85	15
0.940	90	10
0.908	95	5
0.877	100	0

TESIS CON
FALLA DE ORDEN

DIAGNÓSTICO POSTMORTEM. 14

ASPECTOS GENERALES:

1) Investigación en la escena de la muerte.

Hay que investigar lo siguiente:

- a) Relación del cadáver con el tóxico o la fuente de intoxicación.
- b) Existencia de equipo o sistemas con una mala combustión.

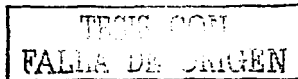
2) Antecedentes de la víctima.

Hay que conocer lo siguiente:

- a) Exposición a tóxicos debido al trabajo, profesión o comercio
- b) Indicio de homicidio: amenaza de muerte, tóxico de olor poco llamativo.
- c) Indicios de suicidio: tentativas o declaraciones previas, estados depresivos o situaciones de frustración.
- d) Indicios de accidente: exposición a tóxicos gaseosos.

ASPECTOS ESPECIALES:

- a) Fuente generadora del gas.
- b) Posición de la víctima respecto a esta fuente.
- c) Empleo de frazadas y otro medio para aumentar la concentración del gas en un espacio cerrado.
- d) Ventanas y puertas cerradas y con cerrojos.
- e) Hendiduras obturadas con papel, trapos u otro material.
- f) En cocinas de gas observar si hay quemadores abiertos, no apagados.
- g) Cuando la fuente de gas fue el motor de un automóvil, observar si las puertas de la cochera están cerradas y con cerrojos; si el motor está encendido o caliente; si hay gasolina en el depósito; si hay signos de que el motor hubiese sido reparado recientemente; si la carrocería muestra filtraciones de gas del tubo de escape de la cabina.
- h) Debe establecerse si la víctima pudo estar inconsciente a causa de enfermedad o traumatismo mientras inhalaba el gas.



PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS. ¹⁴

Tanto líquidos orgánicos como fragmentos de vísceras deben preservarse en frascos de vidrio, limpios, con boca ancha y tapa de material plástico, de rosca.

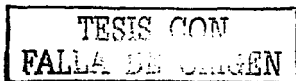
Cada órgano o líquido debe colocarse en frasco separado. Cuando se trate de pequeñas cantidades de líquido se emplean tubos de ensayo, que pueden cerrarse con tapones de goma.

El medio de preservación por excelencia es la refrigeración. Sólo en el caso de muestras de sangre conviene agregar un preservante químico como el fluoruro de sodio, en cantidades de 10 mg/mL.

De preferencia deben de utilizarse tubos Vacutainers y puede ser almacenada por un lapso de 2 años en refrigeración.

Muestras para análisis toxicológico.

- 1.- Sangre: Se requieren por lo menos 10 mL.
- 2.- Cerebro: Por lo menos 500 g.



CONCLUSIONES

Al buscar técnicas para la determinación de la carboxihemoglobina en intoxicaciones por monóxido de carbono, encontré que las podemos clasificar en dos las que son: cualitativas o presuntivas y las cuantitativas. Dentro de las cualitativas podemos ver que la microdifusión sería una forma indirecta de identificar la carboxihemoglobina ya que lo que en realidad reacciona es el monóxido de carbono que se libera de la muestra.

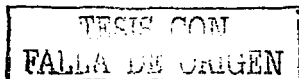
La importancia que tiene la determinación de la carboxihemoglobina en el ámbito forense es de gran relevancia, ya que para poder dar un informe de la causa de la muerte es importante el tiempo en el que se lleva a cabo el dictamen, por lo que es necesario contar con técnicas presuntivas que nos permitan dar el primer paso.

Ya teniendo una prueba presuntiva positiva, procedemos a realizar alguna de las técnicas la que más se ajuste tanto a tiempo, reactivos, equipo así como a la experiencia en el manejo de la técnica.

Como podemos ver, al leer este trabajo observamos que la mayoría de las técnicas están enfocadas hacia la espectrofotometría, que es el método analítico más utilizado y que da buenos resultados. Y que las variantes son el tratamiento que se le da a la muestra, así como el manejo de los resultados al utilizar diferentes fórmulas.

Otro método muy utilizado es la cromatografía de gases, pero lo cual implica tener un laboratorio con mucho equipo y que se utilicen reactivos, de alta pureza, los cuales son costosos. Una de las ventajas de este método, es que el análisis puede ser automatizado y que se pueden analizar varias muestras dependiendo de la capacidad del equipo.

Al estudiar cada una de las técnicas, la metodología para aplicar en un laboratorio forense puede quedar de la siguiente forma: Emplear cualquiera de las técnicas cualitativas, dependiendo de los reactivos con los que se cuenten. Después sería factible realizar alguna de las dos técnicas que se mencionan a continuación: Método espectrofotométrico de Heilmeyer (M) o la Determinación espectrofotométrica de monóxido de carbono en sangre (I), ya que me parece que son los métodos más rápidos, que no requieren de mucho material y reactivos además de ser confiables en los resultados que arrojan.



HEMOGLOBINA.

La hemoglobina es esencial en los grandes organismos para suministrar el oxígeno necesario a los tejidos. En los seres humanos la hemoglobina representa el principal componente de los glóbulos rojos y, cuando está oxigenada, es responsable del color rojo de la sangre. Un solo glóbulo rojo contiene alrededor de 280 millones de moléculas de hemoglobina, cada una de las cuales contiene cuatro átomos de hierro que son cruciales para el transporte de oxígeno.

QUÍMICA DE LA HEMOGLOBINA.

Si bien la estructura exacta de esta molécula muy grande no se conoce por completo, las modernas técnicas de análisis han revelado la mayor parte de la información vital. Las propiedades químicas de esta molécula crucial y fascinante desde el punto de vista biológico son fundamentales para apreciar el papel de la hemoglobina como "transportador de oxígeno".

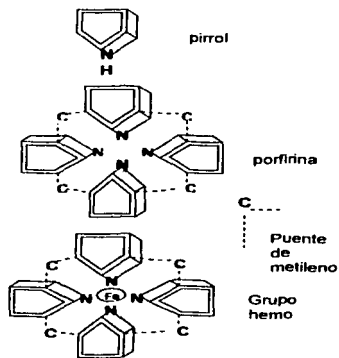


Fig. A-1 Estructura química del grupo hemo

Esquemáticamente en la Figura A-1, se ve la unión cíclica de cuatro anillos pirrol por puentes de metileno determinan una molécula de porfirina. Estas sustancias tienen importancia biológica porque forman con facilidad enlaces covalentes con los metales. El ion ferroso tiene seis electrones en la órbita externa que están disponibles para el enlace electrovalente (Figura A-2). Cuando un ion ferroso (Fe²⁺) se combina con un anillo porfirina se forman cuatro enlaces electrovalentes con los cuatro átomos de nitrógeno del pirrol, lo que da origen a un grupo hemo (vease Figura A-1). Los aminoácidos se combinan químicamente para formar cadenas polipeptídicas con un nitrógeno imidazol en cada extremo capaz de enlace covalente. Dos cadenas polipeptídicas alfa y dos beta se combinan para formar la proteína globina.¹²

Cuatro moléculas del grupo hemo y una molécula de globina forman un enlace covalente con los dos electrones restantes de los átomos de hierro. El sexto sitio de enlace covalente entre el hierro y la cadena polipeptídica es capaz de combinarse reversiblemente con oxígeno. Así, la molécula de hemoglobina se puede combinar de modo reversible con cuatro moléculas de oxígeno, lo que hace que la sangre sea de color escarlata, mientras que la hemoglobina libre de oxígeno confiere a la sangre un matiz púrpura.

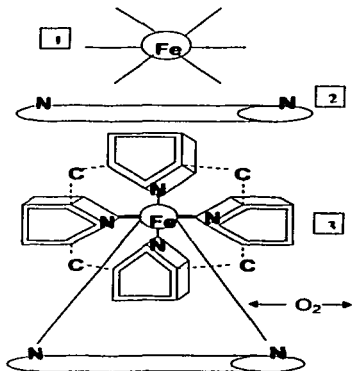


Fig. A-2

Fig. A-2 1. Ion ferroso (Fe^{++}) con seis enlaces electrovalentes potenciales. 2. Representación esquemática de una cadena polipeptídica con dos nitrógenos imidazol que son capaces de formar enlaces covalentes con los iones metálicos. Una molécula proteica que contiene dos cadenas polipeptídicas alfa y dos beta se conoce como molécula de globina.

3. Molécula del grupo hemo unida a la cadena polipeptídica. Cuatro moléculas del grupo hemo unidas a las cuatro cadenas polipeptídicas de una molécula de globina constituyen la molécula de hemoglobina.¹²

Cuando el oxígeno está unido a la hemoglobina, ésta recibe el nombre de oxihemoglobina (HbO_2). Es clásico referirse a la hemoglobina libre de oxígeno como hemoglobina reducida (Hb). El término "hemoglobina reducida" es una denominación química que induce a error, porque la hemoglobina está reducida (Fe^{2+}) tanto en las formas oxigenadas como en las no oxigenadas. Este término, aunque incorrecto desde el punto de vista químico, se utiliza regularmente en fisiología respiratoria para referirse a la hemoglobina libre de oxígeno.

ANEXO 2.¹²

OXIMETRIA.

Es un término general que se relaciona con las diversas tecnologías capaces de medir la saturación de la oxihemoglobina. En la actualidad hay tres tecnologías que aportan datos oximétricos en la práctica clínica: 1) espectrofotometría para análisis in vitro de moléculas de hemoglobina, 2) oximetría de pulso para medición no invasiva de la saturación de la oxihemoglobina y 3) oximetría de fibra óptica para determinación in vivo de la saturación de la oxihemoglobina. En este caso nos enfocaremos a la espectrofotometría.

ESPECTROFOTOMETRIA

Toda la oximetría se basa en principios espectrofotométricos que miden las porciones de luz transmitida o absorbida por la molécula de hemoglobina. Comprender estos principios físicos exige un conocimiento básico de la física de luz.

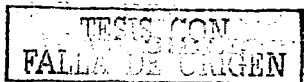
Física de la luz.

La luz en una forma de energía electromagnética comparable con las ondas en un estanque de agua quieta después de dejar caer un guijarro. La longitud de onda es la distancia de un pico de onda a otro y varía alrededor de 0,1 nm (10^{-9}), para los rayos gamma, y alrededor de 25 cm para las ondas de radio. La configuración de onda continua de un pico al próximo se denomina ciclo y la frecuencia es el número de ciclos por segundo; la relación entre las dos características es fija e inversa. Las propiedades de energía de la luz se conocen como cuantos. Así la intensidad de un haz de luz se refiere al número de cuantos generados por segundo.

Los átomos de cualquier molécula vibran constantemente con un patrón que no difiere del de las vibraciones generadas por las ondas de luz. Por lo general, la luz que atraviesa una sustancia que tiene una frecuencia de vibración similar tenderá a ser absorbida. La fracción de luz absorbida en una determinada longitud de onda se denomina coeficiente de absorción específica o coeficiente de extinción, en el que se expresan condiciones prescritas para factores como pH, temperatura y solventes específicos. Las características de absorción en diversas longitudes de onda pueden ser dibujadas como un espectro, en esencia, un gráfico de la absorbancia de energías electromagnéticas de una molécula en diversas longitudes de onda.

Espectrofotómetro.

A mediados del siglo XVII Isaac Newton observó un "espectro" de color emitido por un prisma expuesto a la luz solar. En el siglo XIX se observó una relación entre espectros de luz y electricidad, dado que el potencial entre dos electrodos en solución se modificaba cuando uno



era iluminado. A comienzos del siglo XX esta observación ha sido desarrollada en una práctica célula fotoeléctrica para la medición de la luz absorbida.

Los principios fotoeléctricos permiten traducir la intensidad de la luz en corriente eléctrica, que es la base de los espectrofotómetros modernos. Por ejemplo, una luz de intensidad dada que atravesara una sustancia específica determinaría alguna fracción de luz transmitida a una superficie metálica revestida de óxido. La corriente resultante sería directamente proporcional a la intensidad de luz transmitida.

Abrazando estos principios físicos, la tecnología de estado sólido de la década de 1960 posibilitó los espectrofotómetros actuales.

CO-OXÍMETRO

Los co-oxímetros modernos son espectrofotómetros que analizan de modo simultáneo cuatro fracciones de la hemoglobina: hemoglobina reducida, oxihemoglobina, carboxihemoglobina y metahemoglobina. Como se ilustra en la figura A-3 los componentes básicos de un co-oxímetro son una fuente de luz, una serie de lentes, filtros, espejos que enfocan el haz de luz, una cubeta o celda de muestra, un elemento monocromático que aísla las longitudes de onda de interés usando filtros o parrillas, y detectores fotodiodos que emiten electrones en proporción con la cantidad de luz que incide en sus superficies. Los electrones emitidos (corriente) alimentan un circuito cuya energía de salida (output) es proporcional a la absorbancia relativa de la muestra.

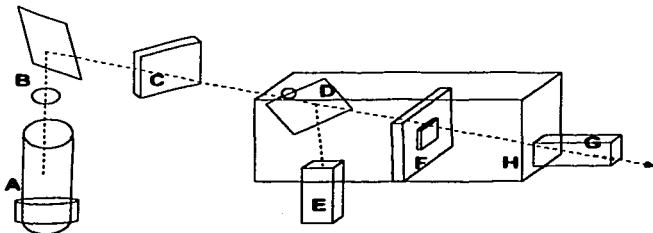


Fig. A-3. Componentes básicos del co-oxímetro. A fuente de luz, B lente y espejo, C elemento monocromático, D divisor del haz, E detector de referencia, F cubeta, G detector de muestra, H bloque regulado por temperatura.¹²

PRINCIPIO DE OPERACIÓN.

Según el fabricante, los co-oxímetros obtienen y almacenan lecturas de absorbancia en una solución control en cuatro o más longitudes de onda diferentes: λ_1 , λ_2 , λ_3 y λ_4 nm. Por lo general, las absorbancias control se actualizan cada 30 minutos de desuso o después de cada muestra.

Cuando se introduce una muestra diluida y bemolizada se obtiene una lectura de absorbancia en cada longitud de onda. Las correspondientes absorbancias control son restadas de estas mediciones y las cuatro absorbancias resultantes son multiplicadas por el coeficiente de extinción apropiado para obtener las concentraciones (ley de Beer):

$$\begin{aligned}C_R &= K (E_{1R}A_1 + E_{2R}A_2 + E_{3R}A_3 + E_{4R}A_4) \\C_{O_2} &= K (E_{1O_2}A_1 + E_{2O_2}A_2 + E_{3O_2}A_3 + E_{4O_2}A_4) \\C_{CO} &= K (E_{1CO}A_1 + E_{2CO}A_2 + E_{3CO}A_3 + E_{4CO}A_4) \\C_M &= K (E_{1M}A_1 + E_{2M}A_2 + E_{3M}A_3 + E_{4M}A_4)\end{aligned}$$

Donde C es la concentración de cada fracción de la Hb, K es la constante escalar establecida por el procedimiento de calibración de la Hb, E es cada coeficiente de extinción de la matriz (cuatro fracciones de la Hb en cuatro longitudes de onda) y A es el valor de absorbancia de la sangre en cada longitud de onda. La hemoglobina total es la suma de las cuatro concentraciones calculadas. Después se calcula el porcentaje de los valores de concentración para HbO₂, HbCO, HbMet y HbR.

El co-oxímetro es el método existente más exacto para medir las cuatro fracciones de la hemoglobina clínicamente importantes y es considerado el estándar contra el que se deben comparar otros métodos. El co-oxímetro está reglamentado por las Clinical Laboratory Improvement Amendments de 1988 y su uso debe cumplir con los estándares enumerados en esta reglamentación.

LIMITACIONES DEL CO-OXÍMETRO.

El colorante azul de metileno tiene una absorbancia pico en la región infrarroja cercana a la roja y afectará las mediciones de los métodos de oximetría que usan longitudes de onda en la región roja e infrarroja. Sin embargo, el error es bastante menor con los co-oxímetros que utilizan longitudes de onda en las regiones cercanas a la roja y en la visible porque la cercana a la roja es solo una de las varias absorbancias usadas para cuantificar las fracciones de la hemoglobina.

Cualquier sustancia de la muestra que disperse luz afectará las mediciones del co-oxímetro porque la cantidad de luz transmitida ya no solo es una función de la luz absorbida por las fracciones de la hemoglobina. Los lípidos y los fragmentos celulares resultantes de la hemólisis incompleta son las causas más comunes de errores de este tipo.

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

GLOSARIO ^{5.40}

Anoxia: Ausencia completa del oxígeno.

Bradipnea: Respiración lenta.

Carboxihemoglobina: (COHb) Combinación de óxido de carbono y hemoglobina, que se encuentra en la sangre después de la intoxicación por aquel gas. No puede ser sustituida por el oxígeno y, por consiguiente, impide la función oxidante de los hematíes.

Cefalalgia: Dolor de cabeza, cefalea.

CO: Monóxido de carbono.

Colapso: Estado de postración extrema y depresión repentina, con debilidad de las funciones cardiocirculatorias, que se manifiestan en forma de hipotensión y disfunción orgánica por isquemia

Hb: Hemoglobina.

Hepatomegalia: Aumento del volumen del hígado, que lo hace palpable por debajo del reborde costal derecho.

Hiperpirexia: (Hipertemia) Elevación de la temperatura corporal.

Hiperbárico: Caracterizado por una presión o peso mayor que lo normal; el término se aplica a gases que se encuentran a una presión mayor que la atmosférica (p.ej. oxigenación).

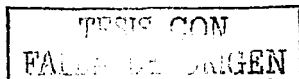
Hipoxia: Deficiencia de oxígeno en los tejidos corporales.

Leucocitosis: Aumento en el número de los leucocitos de la sangre periférica (por encima de 10.000/mm³).

MetHb: Metahemoglobina.

O₂: Oxígeno.

Oxihemoglobina: Hemoglobina que tomó oxígeno en los pulmones y lo transporta por las arterias para abandonarlo en la intimidad de los tejidos O₂Hb.



PO₂: Presión parcial ejercida por el oxígeno disuelto.

Policitemia: Aumento en el número de glóbulos rojos de la sangre.

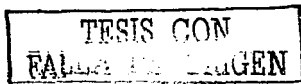
Prodrómico: Premonitorio; que precede a una enfermedad.

Punto isobéptico o isobético: Se da a la longitud de onda de un espectro de absorción en la que las absortividades molares de dos o más especies interconvertibles capaces de absorber radiación son iguales.

Rabdomiólisis: Destrucción o degeneración de tejido muscular debido en especial a traumatismos.

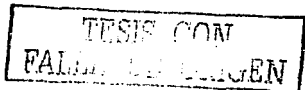
Respiración de Cheyne-Stokes: Tipo de respiración caracterizado por las variaciones rítmicas en la intensidad, observado especialmente en los estados comatosos de origen cerebral, que consiste en el aumento gradual de los movimientos respiratorios hasta un máximo, seguido por un descenso, también gradual, que llega a la cesación completa por espacio de 10 a 40 seg.

Taquipnea: Respiración acelerada, superficial.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1.- Bhagavan, N.V. "Bioquímica" 2da ed. Nueva editorial interamericana; México DF. 1983, 631.
- 2.- Clark, E.G.C. "Insolation and identification of drugs"; The Pharmaceutical Press; 1986; 6, 20-21.
- 3.- Clark, George L, "Enciclopedia de química"; Ediciones OMEGA; España; 1961; 899-904.
- 4.- Clayton, George; "Patty's industrial higiene and toxicology"; Wiley-interscience publication; USA; Vol. 1, 1978; 622-625, 635, 640-641.
- 5.- Diccionario terminológico de ciencias médicas; Ed. Salvat 1994.
- 6.- Gisbert, Globaig; "Medicina legal y toxicología"; Masson-Salvat; 4 ed; 576-579, 588-589
- 7.- Goodman & Gilman; "Las bases farmacológicas de la terapéutica"; Ed. Medica Panamericana; 9na ed; 1996; 1784-1787.
- 8.- Harrison; "Principios de la medicina interna"; 15va ed.; Vol. I; Macgraw Hill; 1998; 789-790.
- 9.- Knight, Bernard. "Medicina forense de Simpson"; Ed.El manual moderno; México; 1999; 243-246.
- 10.- Rémington "Farmacia" Tomo 2, 19ed; Editorial medica panamericana; 1999; 2879-2891.
- 11.- Seligson, David. "Métodos seleccionados de análisis clínico"; Impresos Musigraf Arabisa; Vol. IV, 1972, 40-49.
- 12.- Shapiro, Barry. "Manejo clínico de los gases sanguíneos"; 5ta ed.; Editorial medica panamericana; Argentina; 1996; 28-33, 173-175, 296-301.
- 13.- Tintinalli, J.E. "Carbon monoxide clinical management of poisoning and drug overdose" , Philadelphia; 1983; 748-753.
- 14.- Vargas Alvarado, Eduardo; "Medicina forense y deontologia medica"; Ed. Trillas; México; 1991; 729-743, 758-761



15.- Willard. H.H. "Métodos instrumentales de análisis", Grupo editorial iberoamericana S.A de C.V.; México; 1991; 161-162.

16.- Simultaneous determination of carboxyhaemoglobin and total haemoglobin in carbon monoxide-intoxicated patients by use of third- derivative spectrophotometry.; Analytical abstracts, volume 56 (1) january 1994; 1F218.

17.- Determination of total haemoglobin in forensic blood samples with special reference to carboxyhaemoglobin analysis; Analytical abstracts, volumen 54 (2) february 1992; 2F234.

18.- Carbon monoxide stability in stored post-mortem blood samples; Analytical abstracts, volumen 63 (4) april 2001; 4F40.

19.- Ayres, S.M. "Effects of low concentrations of carbon monoxide", Part IV Myocardial and systemic responses to carboxyhemoglobin. Ann. N.Y: Acad. Sci 1970: 174, 268-293.

20.- Bokonjic, N. "Stagant anoxia and carbon monoxide poisoning"; Electroencephalogr, Clin, Neurophysiol; Suppli 21 (1963) 1-102.

21.- Choi, L.S. "Delayed neurologic sequelae in carbon monoxide intoxication"; Arch. Neurol. ;40 (1983) 433-435.

22.- Finck, P.A. "Exposure to carbon monoxide: review of the literature an 367 autopsies. Milit, Med.; 131; (1966) 1513-1539.

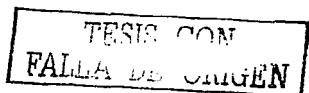
23.- Goldsmith J. R. "Carbon monoxide and human health" Science. 162 (1968) 1352-1359.

24.- Longo, L.D. "The biological effects of carbon monoxide on the pregnant woman, fetus and newborn infant" Am. J. Obstet. Gynecol; 129 (1977) 69-103.

25.- Maeda, H, Fukita, K, Oritani, S, Nagai, K, Zhu, B.-L. "Evaluation of post-mortem oxymetry in fire victims"; Forensic Science Internacional; 81 (1996) 201-209.

26.- Maeda, H, Fukita, K, Oritani, S, Ishida, K, Zhu, B.-L, "Evaluation of post-mortem oxymetry with refernce to the cause death", Forensic science International; 87 (1997) 201-210.

27.- Marks. G.S, Brien, J.F, Nakatsu, K, McLaughlin, B.E. "Does carbon monoxide have a physiological function"; Trends Pharmacol. Sci. 12 (1991) 185-188.



- 28.- Oritani, S, Nagai, K, Zhu, B-L, Maeda, H, " Estimation of carboxyhemoglobin concentrations in thermo-cogulated blood on a CO-oximeter system: an experimental study" ; *Forensic Science International* ; 83(1996), 211-218.
- 29.- Peterson, J.E, and Stewart, R.D, "Absorption and elimination of carbon monoxide by inactive young men. *Arch. Environ, Health*; 21 (1970), 165-171.
- 30.- Shigeki, Oritani, Et al, "Automated determination of carboxyhemoglobin contents in autopsy materials using head-space gas chromatography / mass spectrometry"; *Forensic Science International*; 113 (2000) 375-379.
31. Thomsen, H.K. "Carbon monoxide-induced atherosclerosis in primates. An electron-microscopic study on the coronary arteries of macacus monkey", *Artherosclerosis*; 20 (1974) 233-240.
- 32.- Yukawa, N, Suzuoka, T, Saito, T, Forrest, A.R.W., Osawa, M, Takeichi, S, "Current CO-oximeters", *Forensic Science Internacional*; 94 (1998) 211-215.
- 33.- National Research Council. *Carbon monoxide* National Academy of Science, Washington D.C. 1977.
- 34.- Sayers, P.R. *Review of Carbon monoxide Poisoning Public Health Boletín No. 195* U.S. Government Printing, Office, Washington D.C. 1930.
- 35.- Stewart, R.D. "The effects of carbon monoxide on humans"; *Ann. Rev. Pharmacol.* 15 (1975) 409-422.
- 36.- Lynch, M.J, "Métodos de laboratorio" ,2da ed. Nueva editorial interamericana; México, 1985, 381-383.
- 37.- Tood, S.D. "Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio", Tomo I, 7ma ed, Salvat editores; España, 1985, 861-862.
- 38.- Bauer, J.D. "Análisis clínicos, métodos e interpretación"; Ed. Reverte; España, 1986, 45-46, 719-721.
- 39.- *Manual de procedimientos. Procuraduría General de Justicia, 2000.*
- 40.- Bennington, J. "Diccionario del laboratorio clínico". Ed. Medica Panamericana; Argentina, 1991