



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO EN SANGRE EN EL AREA FORENSE

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

**PRESENTA:
SALVADOR MANRÍQUEZ SÁNCHEZ**

**ASESOR
M. en F.B. PATRICIA BALBINA ANGUIANO RODRÍGUEZ**

**CO-ASESOR
M. en F.B. ELISA LÓPEZ LOEZA**

Julio 2012

Revisores:

M.C. Lorena Cabrera Navarro

M.C. Gabino Estévez Delgado

Q.F.B. Elvira Ramos López

Ing. Pavel Victoria Tafoya

M.C. Luz Elena Arévalo León

RESUMEN

La ciencia criminalística es una ciencia que mediante la aplicación de sus conocimientos, metodología y tecnología, descubre y verifica de manera científica un hecho presuntamente delictuoso y al o los presuntos autores y a sus cómplices. La química forense es una disciplina que auxilia a la ciencia criminalística y para llevar a cabo ésta, se necesitan técnicas y equipo especializado. Una de estas técnicas es la espectrofotometría UV-Vis, que mide la cantidad de luz absorbida y transmitida por una sustancia, y por lo tanto su concentración. Esta técnica sirve para identificar diversas sustancias de interés forense como lo es el monóxido de carbono que es un gas tóxico, incoloro, inodoro e insípido que se produce durante la quema de combustible y que es causante de un gran número de intoxicaciones cada año. Este gas se une con una gran facilidad a la hemoglobina, sustituyendo el oxígeno que ésta transporta y formando así carboxihemoglobina. Cuando las cantidades de carboxihemoglobina en el organismo son muy altas, aparecen síntomas como dolores de cabeza severos, convulsiones, coma y la muerte. En esta tesis se estandariza un método para la cuantificación del monóxido de carbono en sangre, para apoyar las técnicas cualitativas que se realizan dentro del laboratorio de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Michoacán. Para auxiliar a la metodología y a la medición del gas, se elabora dentro del laboratorio un control positivo de carboxihemoglobina, éste se midió con espectrofotometría UV-Vis y se obtuvo un resultado de 61% de carboxihemoglobina. Se le aplicaron ciertas pruebas estadísticas para evaluar la veracidad de los resultados, obteniendo resultados positivos para el objetivo de esta tesis.

Índice

1. Abreviaturas	6
2. Introducción	7
2.1 Ciencia criminalística	7
2.2 Espectrofotometría	10
2.2.1 Generalidades	10
2.2.2 Espectrofotometría UV-Vis	12
2.3 Monóxido de carbono	19
2.3.1 Descubrimiento del monóxido de carbono	19
2.3.2 Generalidades del monóxido de Carbono	20
2.3.3 Fuentes de intoxicación	21
• Combustiones incompletas	21
• Gas del alumbrado	21
• Otras fuentes	22
2.3.4 Etiología de la intoxicación	23
• Criminal	23
• Suicida	23
• Accidental	23
• Profesional	23
2.3.5 Dosis tóxica	24
2.3.6 Mecanismo de toxicidad	24
2.3.7 Sintomatología	26
2.4 Tejido hemático	26

2.5 Hemoglobina	28
2.6 Carboxihemoglobina (COHb)	29
2.6.1 Identificación de carboxihemoglobina	31
2.6.1.1 Técnicas químicas de orientación	31
• Ensayo de dilución	32
• Ensayo alcalino	32
• Microdifusión	32
2.6.1.2 Técnicas instrumentales	33
• Cromatografía de gases	33
• Método espectrofotométrico	34
3. Antecedentes	38
3.1 Antecedentes históricos sobre la hemoglobina	38
3.2 Antecedentes históricos sobre la carboxihemoglobina	39
3.3 Referencias en la historia de intoxicaciones con monóxido de carbono	42
4. Objetivo	44
4.1 Objetivo general	44
4.2 Objetivos particulares	44
5. Hipótesis	45
6. Justificación	46
7. Metodología y experimentación	47
7.1 Material, reactivos y equipo	47

7.2 Preparación del control positivo de referencia mediante la síntesis de monóxido de carbono	48
7.3 Pruebas de orientación	50
7.4 Procedimiento para cuantificación de carboxihemoglobina	51
7.5 Pruebas estadísticas	53
8. Resultados	55
8.1 Preparación del control positivo de referencia	55
8.2 Pruebas de orientación	57
8.3 Determinación de la carboxihemoglobina	59
9. Discusión	63
10. Conclusiones	67
11. Glosario	68
12. Bibliografía	70

1. ABREVIATURAS

μL – Microlitros

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ARN - Ácido ribonucleico

CG - Cromatografía gaseosa

CO - monóxido de carbono

COHB - carboxihemoglobina

H_2SO_4 - Ácido Sulfúrico

Hb - Hemoglobina

HCOOH - Ácido fórmico

Na_2CO_3 - Carbonato de sodio

NaOH - Hidróxido de Sodio

nm - Nanómetros

PdCl_2 - Cloruro de paladio

RMN - Resonancia Magnética Nuclear

UV-Vis - Ultravioleta – visible

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Ciencia criminalística

Las primeras definiciones, consideran a la Criminalística como auxiliar del derecho penal, en la actualidad algunas ramas criminalísticas son utilizadas en el derecho en general (Jiménez, 2004).

Es una ciencia natural y penal que mediante la aplicación de sus conocimientos, metodología y tecnología al estudio de las evidencias naturales asociativas, descubre y verifica de manera científica un hecho presuntamente delictuoso y al o los presuntos autores y a sus cómplices, aportando las pruebas materiales y periciales a los organismos que procuran y administran justicia mediante estudios identificativos y reconstructivos e informes o dictámenes expositivos o demostrativos (Montiel, 1993).

Todas las técnicas criminalísticas tienen por objeto preservar los indicios de su destrucción, para poderlos estudiar, “*in situ*”, si no pueden transportarse o ser llevados para su estudio pericial al laboratorio (Reyes, 1998).

Al incluir a la Criminalística en el grupo de las ciencias forenses, ésta adquiere la calidad científica que requiere toda investigación, de un presunto hecho delictivo, ya que utilizará todos los conocimientos y métodos, es decir, la aplicación de todas las experiencias aprendidas en otras ciencias, así como los procedimientos que se siguen para hallar la verdad y enseñarla, coadyuvando con esto de manera científica a la administración de justicia (Jiménez, 2004).

La investigación criminalística, funda sus tareas profesionales en el estudio científico de las evidencias materiales y se debe prever que el empírico no confunda con sus argumentos y estar atento a los razonamientos del científico.

Una vez fijado el sitio del suceso o escena del crimen, con todos los detalles, el Ministerio Público junto con los peritos, deben tomar en cuenta cada indicio recogido en el lugar de los hechos (Reyes, 1998).

El estudio de las evidencias materiales en la investigación criminalística, tanto en el campo de los hechos, como en el laboratorio, llevan a un objetivo general definido en cinco tareas:

1. Investigar técnicamente y demostrar científicamente, la existencia de un hecho en particular probablemente delictuoso.
2. Determinar los fenómenos y reconstruir el mecanismo del hecho, señalando los instrumentos u objetos de ejecución, sus manifestaciones y las maniobras que se pusieron en juego para realizarlo.
3. Aportar evidencias o coordinar técnicas o sistemas para la identificación de la víctima, si existiese.
4. Aportar evidencias para la identificación de los presuntos autores o coautores
5. Aportar las pruebas materiales con estudios técnicos y científicos para probar el grado de participación del o de los presuntos autores y demás involucrados.

La criminalística con sus disciplinas científicas auxilia técnicamente al órgano jurisdiccional, con dictámenes periciales en cualquiera de sus ramas, ampliaciones de dictámenes con intervención directa de los peritos (Montiel, 1993).

El conjunto de disciplinas auxiliares que la componen se denominan ciencias forenses y existe un gran número de estas disciplinas como la química forense, dactiloscopia, genética forense, psicología forense, medicina forense, etc.

Estas son algunas de las disciplinas que se encargan de colaborar con la ciencia criminalística:

- Criminalística de campo: Aplica los conocimientos, métodos y técnicas con objeto de proteger, observar y fijar el lugar de los hechos.
- Balística forense: Aplica los conocimientos, métodos y técnicas, con objeto de investigar con sus ramas: interior, exterior y de efectos, los fenómenos, formas y mecanismos de hechos originados con armas de fuego cortas y largas.
- Fotografía forense: Aplica los conocimientos, métodos y técnicas, a fin de imprimir y revelar las gráficas necesarias en auxilio de las investigaciones que aplican todas las disciplinas de la criminalística.
- Odontología legal: Estudia las características de las piezas y arreglos dentales, elabora moldes y fórmulas dentarias con objeto de identificar a personas descarnadas, putrefactas o quemadas.
- Técnicas forenses de laboratorio: Aplican los conocimientos, métodos y técnicas de las ciencias naturales, Química, Física y Biología, a fin de realizar los estudios y manejo propio de instrumental científico, para identificar y comparar las evidencias materiales asociadas a hechos presuntamente delictuosos.

Todas ellas son independientes y se aplican en la investigación de los delitos, con sus propios métodos, técnicas y conocimientos (Montiel, 1993).

Una de las disciplinas que auxilian a la criminalística es la química forense, para llevar a cabo el desarrollo de esta ciencia se requieren técnicas específicas y equipo automatizado, que permitirán complementar la investigación.

2.2 Espectrofotometría

2.2.1 Generalidades

Es la técnica de análisis óptico basada en la propiedad física según la cual cada elemento en la naturaleza tiene un patrón de absorción de luz específico, permitiendo la medición de la absorción o la transmisión de luz por las sustancias, y en consecuencia, su concentración (Nicolás, Ruiz, Jiménez, Net, 2011)

Propiedades de la luz

- Las ondas de la luz constan de campos eléctricos que oscilan en planos perpendiculares entre sí.
- La longitud de onda (λ), es la distancia entre las crestas de dos ondas, la frecuencia (ν), es el número de oscilaciones completas de una onda en un segundo.

La relación entre frecuencia y longitud de onda es (Ecuación 1.2.1):

$$\nu\lambda = C \quad \text{[Ecuación 1.2.1]}$$

Donde C es la velocidad de la luz (Harris, 2003).

Es una de las técnicas experimentales más utilizadas para la detección específica de moléculas. Se caracteriza por su precisión, sensibilidad y su aplicabilidad a moléculas de distinta naturaleza y estado de agregación. Los fundamentos físico-químicos de la espectrofotometría son relativamente sencillos.

Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Las técnicas espectrofotométricas se basan en la capacidad que

tienen las moléculas y los átomos de absorber radiaciones de diferente longitud de onda, característica para cada sustancia, utilizando la energía de dichas radiaciones para producir cambios energéticos en su estructura. En los átomos estos cambios se refieren exclusivamente a transiciones electrónicas. En las moléculas los cambios energéticos son debidos a movimientos electrónicos, así como movimientos de vibración y rotación de la molécula.

Cuando la luz pasa a través de una solución que contiene una sustancia capaz de absorberla, una parte es absorbida, otra reflejada, y el resto transmitida (Calabuig, 1998).

La relación entre la absorción de luz por una solución diluida o por un gas y la concentración de la fase absorbente viene dada por la ley de Beer. La relación entre la absorción de la luz y el camino recorrido por esta viene dada por la ley de Lambert. Es conveniente considerar ambas leyes conjuntamente (Walton, Reyes, 2005).

La Ley de Lambert-Beer es una ecuación fundamental en los métodos espectrométricos de análisis, ya que permite calcular la concentración de una sustancia a partir de la radiación absorbida por una disolución de la misma (Ecuación 2.2.2)

$$A = (a) (b) (C) \quad \text{[Ecuación 2.2.2]}$$

Donde a es la absorptividad, b es la trayectoria del haz incidente y C la concentración de la disolución (Sierra, Pérez, Gómez, Morante, 2010).

Las aplicaciones de este principio derivan del hecho de que las transiciones electrónicas en una molécula dan origen a bandas de absorción específicas a

determinadas longitudes de onda, que pueden ser usadas para la identificación de la molécula (Calabuig, 1998).

Cada sustancia que absorbe luz produce un espectro característico que permite que ésta sea identificada, debido a que presentan un pico de absorbancia a longitud de onda determinada, además de otras características específicas de su espectro (Nordby, 2005).

2.2.2 Espectrofotometría uv/vis

La espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible fue uno de los primeros métodos físicos que se aplicó al análisis cuantitativo y a la determinación de estructuras. Si bien la espectrofotometría infrarroja y de resonancia magnética nuclear RMN son las técnicas más idóneas para el análisis cualitativo y estructural, la espectrofotometría ultravioleta-visible supera al resto de métodos ópticos de análisis en lo referente al análisis cuantitativo y es también una técnica auxiliar para la elucidación de estructuras (Olsen, 1990).

La luz visible

Es una región muy estrecha pero la más importante, ya que nuestra retina es sensible a las radiaciones de estas frecuencias. A su vez, se subdivide en seis intervalos que definen los colores básicos (rojo, naranja, amarillo, verde, azul y violeta).

Fuentes de radiación visible

La fuente más común para la espectrofotometría es una lámpara de incandescencia. El filamento suele ser de tungsteno, que cuando se pone a unos 3000 °C emite un espectro continuo de radiación electromagnética de longitud de onda entre 320 y 750 nm (Sogorb, Vilanova, 2004).

Radiación ultravioleta

Los átomos y moléculas sometidos a descargas eléctricas producen este tipo de radiación. No debemos olvidar que la radiación ultravioleta es la componente principal de la radiación solar.

La energía de los fotones de la radiación ultravioleta es del orden de la energía de activación de muchas reacciones químicas lo que explica muchos de sus efectos (Pasotti, 2006).

Fuentes de radiación ultravioleta

Las llamadas lámparas de arco son las fuentes de radiación ultravioleta más utilizadas en espectrofotometría de absorción. Estas lámparas están formadas por una ampolla hermética interna que contiene dos electrodos conectados a una fuente de energía. La ampolla se rellena con un gas (generalmente H₂, D₂, Ar o Xe, o un vapor metálico de mercurio o sodio). Los electrodos aplican una descarga eléctrica que excita las partículas del gas. Cuando las partículas excitadas vuelven a su estado fundamental, lo hacen emitiendo luz ultravioleta con un espectro continuo de 190 a 320 nm (Sogorb, Vilanova, 2004).

La región ultravioleta se divide, por comodidad, en ultravioleta lejano (de 10 a 190 nm) y ultravioleta próximo (de 190 a 320 nm). La región del ultravioleta lejano suele llamarse también ultravioleta de vacío, puesto que el oxígeno absorbe justo por debajo de 190 nm y son necesarias condiciones específicas para que el oxígeno no interfiera. La división entre las regiones ultravioleta y visible se debe principalmente por razones fisiológicas, puesto que el ojo humano es capaz de percibir las radiaciones de longitud de onda por encima de 320 nm.

Las radiaciones ultravioleta y visible tienen en común que la absorción en ambas regiones provoca la excitación de electrones a niveles de energía superiores. Para excitar a los electrones fuertemente unidos, se requiere en general, fotones energéticos (de longitud de onda corta), mientras que los electrones unidos débilmente (deslocalizados) pueden excitarse con radiación de longitud de onda más larga (Olsen, 1990).

En la espectrofotometría UV/Vis puede hacerse una distinción entre 2 grandes grupos de instrumentos: fotómetros y espectrofotómetros, los primeros son instrumentos sencillos y baratos que utilizan filtros para seleccionar la banda de longitudes de onda que incide sobre la muestra. Como sistema detector usan fotocélula o fototubo. Los espectrofotómetros son instrumentos más complicados y caros que utilizan un sistema monocromador (prisma o red de difracción). Esto permite la variación continua en la selección de la longitud de onda y por tanto, la región espectral permitida es muy amplia (Pérez, Pino, 1983).

Mediante el uso de la espectrofotometría UV-Vis se produce un espectro característico para cada sustancia, obteniéndose un pico de absorbancia a determinada longitud de onda, lo cual permite identificar en forma específica cada sustancia. Esta tecnología está limitada por el hecho de que un espectro UV/Vis tiende a estar caracterizado por un pequeño número de picos anchos y muchos espectros carecen de características altamente específicas (Nordby, 2005).

El instrumento utilizado en la espectrometría ultravioleta-visible se llama espectrofotómetro UV-Vis. Este mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra, y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra. La espectrofotometría es de gran utilidad en el análisis de sustancias químicas sobre todo para el químico analítico.

Las partes básicas de un espectrofotómetro son (Sogorb, Vilanova, 2004):

- Una fuente de luz, que emite la radiación que posteriormente interactúa con la muestra.
- Un sistema monocromador que permita separar bandas de luz estrechas, ya sea antes o después de la interacción de la luz con la muestra. El monocromador está constituido por lentes, espejos, redes de difracción,

primas de refracción, rendijas, etc.

- Un compartimento para colocar las celdas o cubetas adecuadas, dependiendo de la región del espectro utilizada.
- Un sistema para la detección de radiación que ha atravesado la muestra o sistema detector.

Sistemas electrónicos de amplificación, transformación y comparación de señal. Sistemas de registro de señal o almacenamiento de datos.

Las muestras para espectrofotometría UV-Vis suelen ser líquidas, aunque la absorbancia de los gases e incluso de los sólidos también puede medirse. Las muestras suelen ser colocadas en una célula transparente, conocida como celda. También se pueden usar tubos de ensayo como cubetas en algunos instrumentos. Las mejores cubetas están hechas con cuarzo de alta calidad, aunque son comunes las de vidrio o plástico. El cristal y la mayoría de los plásticos absorben en el UV, lo que limita su utilidad para longitudes de onda visibles (espectrometría.com, n.d.).

Figura 2.2.1 muestra un espectro ultravioleta-visible es esencialmente un gráfico de absorbancia de luz frente a una longitud de onda en el rango del ultravioleta o la luz visible.

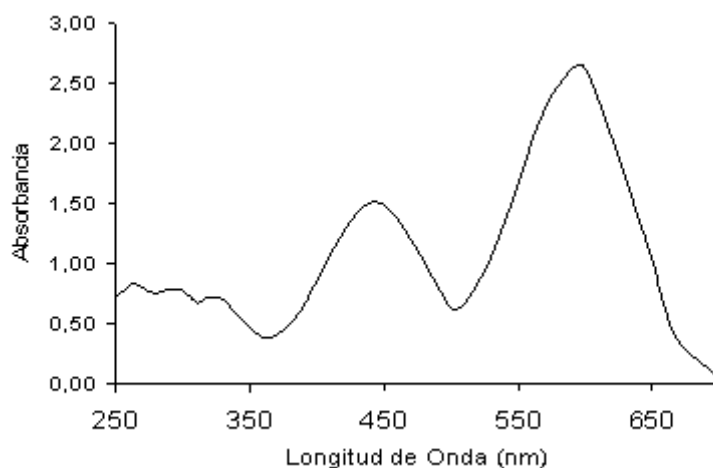


Figura 2.2.1 Espectro ultravioleta-visible.

Aplicaciones de la espectrofotometría UV/Vis

Se utiliza por ejemplo para identificar compuestos por su espectro de absorción, conocer la concentración de un compuesto en una disolución, determinar la glucosa en sangre en un laboratorio de análisis químico, seguir el curso de reacciones químicas y enzimáticas.

El espectrofotómetro es de gran utilidad en análisis cuantitativo de proteínas, en la determinación de ácidos nucleicos incluyendo ADN / ARN, enzimas (Pasotti, 2006).

La identificación de sustancias mediante su espectro de absorción es empírica y se hace por comparación y superposición del espectro correspondiente de un compuesto conocido. Hay que considerar en primer lugar la existencia de máximos y mínimos y la relación de sus alturas, y en segundo lugar, la longitud de onda de los máximos. La sustancia debe absorber en las zonas visibles y UV. El análisis cualitativo fotométrico se aplica generalmente a compuestos coloreados (Pérez et al, 1983).

Tipos de espectrofotómetros

- De un solo haz

En un espectrofotómetro de un solo haz se usa únicamente una trayectoria de luz de la fuente al detector. El instrumento suele operarse a una longitud de onda fija y se emplea principalmente para la determinación cuantitativa de la concentración de un solo componente cuando se analizan muchas muestras (Willard, Merrit, Dean, 1982).

- De haz doble

Todos los componentes están duplicados, menos la lámpara y el medidor. Dos haces de luz pasan al mismo tiempo por los distintos componentes separados en el espacio. Esto compensa las variaciones de intensidad de luz y de absorbancia (Willard et al 1982).

Existen otros tipos de espectrofotometría, como lo son:

Espectrofotometría de Absorción Atómica

La absorción atómica es una técnica capaz de detectar y determinar cuantitativamente la mayoría de elementos del sistema periódico. Este método se puede utilizar para la determinación de ciertos metales. Este método consiste en la medición de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda particular. La especie atómica se logra por atomización de la muestra, siendo los distintos procedimientos utilizados para llegar al estado fundamental del átomo lo que diferencia las técnicas y accesorios utilizados (Cáceres, 2004).

Espectrofotometría de Masas

La Espectrometría de Masas es una poderosa técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas (Payá, 2006).

Espectrofotometría de Infrarrojo

La espectrometría de infrarrojo, es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Como las demás técnicas espectroscópicas, puede ser utilizada para identificar un compuesto o investigar la composición de una muestra.

Es una técnica de análisis espectral cualitativo y semicuantitativo a partir de la absorción selectiva de radiación infrarroja por parte de las distintas sustancias que intervienen en las vibraciones moleculares de la estructura y de los grupos funcionales, tanto orgánicos como inorgánicos (Giannini, Roani, 2003).

Espectrofotometría de Fluorescencia

La espectrometría de fluorescencia es un método analítico que se basa en la emisión de radiación por parte de las moléculas que han sido excitadas con radiación electromagnética apropiada. En la fluorescencia se utiliza radiación ultravioleta para producir la excitación; la radiación emitida generalmente se encuentra en la región visible, sin embargo cuando la longitud de onda de la excitación es menor de 300 nm puede producirse fluorescencia ultravioleta. Raras veces se emplea radiación de longitud de onda inferior a 250 nm para producir la excitación, porque estas radiaciones son lo suficientemente energéticas para causar la foto descomposición de las moléculas (Villegas, Acereto, Vargas, 2006).

2.3 Monóxido de carbono (CO)

2.3.1 Descubrimiento del monóxido de carbono

El descubrimiento del monóxido de carbono es acreditado al químico y teólogo Joseph Priestly. Desde 1772-1779 Priestly gradualmente reconoció la naturaleza de este compuesto y mostró cómo era diferente del dióxido de carbono, con el que regularmente aparecía. Sin embargo el monóxido de carbono había sido ya estudiado durante siglos, antes de los trabajos de Priestly. A finales del siglo XIII el alquimista español Arnolde de Villanueva describió un gas venenoso producido por la combustión incompleta de la madera, y que era muy probablemente el monóxido de carbono.

En el siglo XVIII el químico francés Joseph Marie François de Lassone preparó monóxido de carbono por primera vez. Después de eso, a principios del siglo XIX el químico británico William Cumberland Cruikshank determinó su composición química.

En la Figura 2.3.1 Se observan cuatro formas, que muestran una molécula de monóxido de carbono; el carbono aparece en color gris claro y el oxígeno en color rojo.

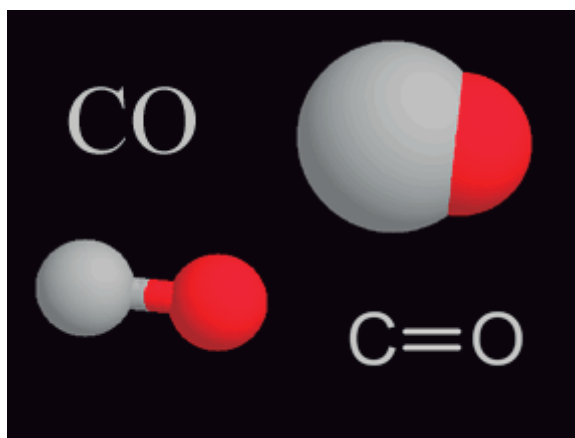


Figura 2.3.1 Molécula del monóxido de carbono

Sin embargo los efectos tóxicos del monóxido de carbono no fueron realmente comprendidos hasta mediados del siglo XIX, cuando el fisiólogo Francés Claude Bernard explicó cómo actuaba el gas en el cuerpo humano (Thomson, 2006).

2.3.2 Generalidades del monóxido de carbono

El monóxido de carbono es un gas tóxico, incoloro, inodoro e insípido que se produce durante la quema de combustible. Madera, aceite, gasolina, gas natural, queroseno y carbón producen este gas al quemarse. Cuando una persona respira monóxido de carbono, dicho gas bloquea la capacidad de la sangre para transportar oxígeno y da lugar a una grave lesión del pulmón y el cerebro, e incluso puede provocar la muerte (Parmet, 2002).

Mucha gente utiliza estos combustibles alrededor del mundo, como resultado el monóxido de carbono se ubica en la atmósfera. Sin embargo sin un instrumento especializado, una persona no puede identificar el gas, debido a que no es irritante, ni presenta características que lo hagan detectable, como olor, sabor etc. Por otro lado, el monóxido de carbono es un peligro potencial para la salud, debido a que la exposición a este gas puede desabastecer de oxígeno órganos críticos, sobre todo corazón y pulmones (Penney, 2008).

La incidencia del envenenamiento con monóxido de carbono es la más alta entre las intoxicaciones dentro de la práctica de la ciencia forense, cerca de 2/3 del total de las muertes por intoxicaciones accidentales en Japón son debido al envenenamiento con CO (Susuki, Watanabe, 2002).

2.3.3 Fuentes de intoxicación

Desde un punto de vista toxicológico interesan dos fuentes de producción de monóxido de carbono.

❖ Combustiones incompletas

La combustión de la materia orgánica da lugar a la formación de anhídrido carbónico, debido a la oxidación del carbono (Ecuación 2.3.1):



Pero sucede a veces que el aporte de oxígeno es insuficiente para oxidar por completo el carbono (combustión incompleta), con lo que se forma monóxido de carbono (Ecuación 2.3.2):



❖ Gas del alumbrado

El gas del alumbrado o gas de ciudad ha desaparecido del consumo habitual en la mayor parte de las ciudades, ya que por diversas razones, en la actualidad se consume preferentemente el gas natural.

La composición del gas de ciudad variaba según la técnica utilizada para destilación. Sus dos principales constituyentes eran el hidrógeno y el metano, así mismo, contenía monóxido de carbono en concentración variable, que oscilaba entre el 5 y el 20%. Los efectos tóxicos del gas de alumbrado correspondían de forma exclusiva al monóxido de carbono.

❖ Otras fuentes

Existen diversas fuentes de monóxido de carbono tales como los automóviles, aún más los autos antiguos; algunas industrias también generan dentro de sus gases de desecho el monóxido de carbono.

El gas butano es una fuente importante de monóxido de carbono, sobre todo cuando las fuentes de éste se encuentran en mal estado.

El cigarro es otra fuente muy común debido a que es muy amplio el número de personas que consumen este producto.

Existen diversas operaciones industriales generan cantidades elevadas de monóxido de carbono, por lo que pueden originarse intoxicaciones profesionales (Calabuig, 1998).

Todos los dispositivos de combustión o flama emiten monóxido de carbono incluso los calentadores radiantes catalíticos. La emisión mundial del monóxido de carbono es de casi 232 millones de toneladas cada año, en tanto que EUA produce 88 millones de éstas.

Los productos de desecho de la combustión incompleta del gas natural o de combustibles de petróleo tienen hasta 5% de monóxido de carbono. Los productos de desecho de motores de combustión interna a gasolina contienen de 3 a 7% de monóxido de carbono (Dreisbach, 2003).

El cigarro, es también considerado una fuente común de monóxido de carbono, las personas que fuman pueden llegar a tener porcentajes de CO en sangre de hasta 10% aproximadamente.

2.3.4 Etiología de la intoxicación

Existen diversas causas médico legales por las cuales se genera una intoxicación con monóxido de carbono, mismas que se mencionan a continuación.

❖ Criminal

Los envenenamientos por el monóxido de carbono son muy raros. Tan sólo se conocen algunos casos en donde el criminal induce a otra u otras personas a provocarse la muerte en grupo, tomando él sus precauciones para evitar la intoxicación.

❖ Suicida

La intoxicación suicida sigue siendo, muy frecuente. Se recurre a cualquiera de las fuentes de producción del monóxido de carbono: los braseros, el gas doméstico y los motores de explosión (es un tipo de motor de combustión interna que utiliza la explosión de un combustible, provocada mediante una chispa).

❖ Accidental

Es la variedad más frecuente de la intoxicación con el monóxido de carbono. Las circunstancias en que ocurre son muy diversas.

Como resultado de una combustión incompleta. Ocurre cuando los medios de calefacción son defectuosos por cualquier razón. Los accidentes por el gas doméstico son frecuentes por imprudencias o descuidos y por averías en los conductores o en las instalaciones caseras.

❖ Profesional

Las intoxicaciones por monóxido de carbono accidentales adquieren la categoría de profesionales cuando son el resultado del trabajo que se realiza en determinadas profesiones u oficios. Así sucede para los mineros cuando la intoxicación se debe a los gases producidos en la explosiones de grisú (Calabuig, 1998).

2.3.5. Dosis tóxica

No puede hablarse de una dosis tóxica absoluta, los efectos tóxicos dependerán de dos variables: la concentración que alcanza en el ambiente y el tiempo durante el cual se respira bajo esta atmósfera contaminada (Calabuig, 1998).

Debido a que la afinidad del CO hacia la hemoglobina es 250-300 veces mayor que la del O₂, el CO interfiere con la transportación del oxígeno por la hemoglobina en el cuerpo humano. Sin embargo, la toxicidad del CO depende de la concentración del monóxido en el aire y el tiempo de inhalación. Un 50% de carboxihemoglobina es un indicador de fatalidad (Susuki et al, 2002).

La tabla 2.3.1 Muestra los porcentajes de Carboxihemoglobina en sangre, respecto al grado de toxicidad, relacionándolos con los síntomas que suelen presentarse.

Tabla 2.3.1. Porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y síntomas por intoxicación con CO (Susuki et al, 2002).

COHb en sangre (%)	Síntomas de intoxicación
0-10	No se presentan síntomas.
10-20	Ligero dolor de cabeza.
20-30	Dolor de cabeza, pulsaciones en la región temporal.
30-40	Severo dolor de cabeza, fatiga en general, mareos, vómito.
40-50	Hiperventilación, coma con convulsiones.
60-70	Coma con convulsiones, disfunción cardíaca.
70-80	Muerte.

2.3.6 Mecanismo de toxicidad

Para que se presente una intoxicación por monóxido de carbono, éste debe estar primero en el ambiente y todo inicia cuando el gas ingresa al organismo.

Como el monóxido de carbono se absorbe directamente a los pulmones y a la sangre, no necesita un metabolismo, por lo cual, en cuanto ingresa al organismo es de suma peligrosidad. El mecanismo de acción del CO, se lleva a cabo en varias etapas, mismas que se describen a continuación:

- Absorción

El monóxido de carbono es absorbido a través de los pulmones y se difunde a través de la membrana capilar alveolar. El intercambio de CO entre el aire inhalado y la sangre es controlado por dos mecanismos, tanto el físico como el fisiológico. Una vez absorbido el monóxido de carbono se difunde a través del plasma, atraviesa la membrana de los eritrocitos y finalmente entra al estroma del eritrocito donde se une fuertemente a la hemoglobina, formando la carboxihemoglobina.

- Distribución

Aunque una cantidad de CO es unido por la mioglobina celular, la mayor parte es unida a la hemoglobina (Fierro, 2000).

La reacción entre el CO y la hemoglobina es reversible, rigiéndose por la ley de masas. Nicloux, que estudió este fenómeno exhaustivamente, elaboró tres leyes fundamentales para el conocimiento de los fenómenos que caracterizan esta intoxicación:

1. El monóxido de carbono desplaza al oxígeno de la oxihemoglobina.
2. El oxígeno desplaza al monóxido de carbono de la carboxihemoglobina.
3. Cuando la sangre está en contacto con una mezcla de ambos gases, la concentración respectiva que alcanzan ambos derivados hemoglobínicos es función de las tensiones parciales que los 2 gases tienen en la mezcla.

El resultado del bloqueo de la hemoglobina por el CO es una disminución de la cantidad de oxígeno contenida en la sangre quedando privados los tejidos del suministro de oxígeno necesario para sus funciones metabólicas (Calabuig, 1998).

- Eliminación

El CO no es un tóxico que se acumule debido a que la carboxihemoglobina es altamente disociable y una vez que la exposición ha cesado la hemoglobina se revertirá a oxihemoglobina y el CO será eliminado a través de los pulmones. La vida media del CO en la sangre en adultos sedentarios es de 2-5 hrs y la eliminación disminuye su velocidad cuando la concentración decrece (Fierro, 2000).

2.3.7 Sintomatología

Cuando se inhala monóxido de carbono, éste reemplaza al oxígeno (O_2) en el torrente sanguíneo y como consecuencia, el corazón, el cerebro y el cuerpo sufrirán por la falta de oxígeno.

Los síntomas varían de una persona a otra y quienes están en mayor riesgo comprenden niños pequeños, ancianos, personas con enfermedad cardíaca y pulmonar, personas en grandes altitudes y fumadores. La afinidad de la hemoglobina fetal al CO es superior a la del adulto.

2.4 Tejido Hemático

La sangre es un tejido líquido que circula a través del cuerpo. Es la encargada de transportar el oxígeno (O_2) a todo el organismo y de recoger el bióxido de carbono producido por los tejidos, para transportarlo al pulmón y ahí cambiarlo nuevamente por O_2 , constituye aproximadamente el 8% del peso corporal y está constituida por una parte sólida y una parte líquida (de Ambriz, 2002).

La sangre está formada por una parte líquida, el plasma (aproximadamente el 60%), y por una parte sólida (aproximadamente el 40%), formada por los eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

El plasma

Es un líquido compuesto en más del 90% por agua, que tiene la función de disolvente y medio de transporte. El resto del plasma está formado por proteínas plasmáticas, lípidos, glúcidos, sales minerales y otras sustancias disueltas.

Células sanguíneas

Eritrocitos

Los eritrocitos son elementos formes (no se les llama célula porque no tienen núcleo), de color rosado y de forma bicóncava que les permite deformarse para pasar por los vasos más estrechos. Su función principal es transportar el oxígeno a los tejidos para que puedan obtener energía y eliminar el CO₂.

Leucocitos

Son células propiamente dichas. Su función es la de acabar con todos los microbios, toxinas y productos a los cuales el organismo está continuamente expuesto.

Trombocitos

Participan en la reparación de los vasos sanguíneos, formando tapones e induciendo a la coagulación de la sangre cuando hay hemorragias (Merí, 2005).

2.5 Hemoglobina

La hemoglobina es una proteína globular, que está presente en altas concentraciones en los glóbulos rojos y su principal función es el transporte de O₂ del aparato respiratorio hacia los tejidos periféricos; y del transporte de CO₂ y protones (H⁺) de los tejidos periféricos hasta los pulmones para ser excretados. Los valores normales en sangre son de 13 – 18 g/dL en el hombre y 12 – 16 g/dL en la mujer (Brandan, 2008). Totalmente saturada, contiene alrededor de 1,34 mL de oxígeno por gramo. La masa de eritrocitos de un adulto contiene unos 600 g de hemoglobina, capaz de transportar 800 mL de oxígeno.

Una molécula de hemoglobina consta de dos pares de cadenas de polipéptidos y cuatro grupos prostéticos hemo, que contienen cada uno un átomo de hierro ferroso.

Cada grupo hemo se localiza en una determinada zona de una de las cadenas de polipéptidos. Localizado cerca de la superficie de la molécula, el grupo hemo se combina de forma reversible con una molécula de oxígeno o dióxido de carbono.

Una de las funciones vitales de los eritrocitos es su participación en el intercambio gaseoso de oxígeno y dióxido de carbono entre los pulmones y los tejidos. La hemoglobina (Hb), es el componente fundamental de este proceso (Peñuela, 2005).

La metahemoglobina, es un derivado de la hemoglobina en que el hierro ferroso se oxida a su forma férrica, lo que origina un color azulado pardo en la piel. El estrés oxidativo secundario a causas exógenas como drogas o toxinas, tiene la capacidad de oxidar el hierro de la molécula del grupo hemo y aumentar los niveles basales de metahemoglobinemia, con la respectiva disminución en el transporte de oxígeno. Con el hierro oxidado la molécula pierde su capacidad para transportar oxígeno o dióxido de carbono (Sanford, 1981).

La metahemoglobina forma parte de la hemoglobina "inactiva"; es incapaz de combinarse de modo reversible con el oxígeno y monóxido de carbono, además

desvía la curva de disociación oxígeno en el sentido de un aumento de su afinidad por este y entorpece por tanto su transporte desde la sangre a los tejidos. Así, cantidades anormales de metahemoglobinemia, causarán una "anemia" funcional con cianosis. Un individuo normal puede tener hasta 0.24 g de metahemoglobina por 100 mL de sangre. La concentración normal media es de alrededor del 0.4% de la hemoglobina total, o alrededor de 0.06g/100 mL de sangre (Brandan, 2008).

La hemoglobina reducida es hemoglobina con hierro no asociado al oxígeno. Cuando cada grupo hemo se asocia con una molécula de oxígeno, la hemoglobina corresponde a oxihemoglobina. Tanto en la hemoglobina reducida como en la oxihemoglobina, el hierro permanece en estado ferroso (Sanford, 1981).

El estudio de su estructura molecular y fisiología ha llamado la atención de innumerables investigadores; de su estudio se han derivado descubrimientos de gran utilidad. Variantes de la hemoglobina resultan de la sustitución puntual de un aminoácido por otro. Hasta 1992, el Centro Internacional de Información sobre Hemoglobinas había reunido las 640 variantes de esta molécula, pudiendo agregarse hemoglobinopatías, particularmente las que se acompañan de trastornos clínicos y las talasemias son habituales (Brandan, 2008).

2.6 Carboxihemoglobina (COHB)

La carboxihemoglobina es una forma anormal de hemoglobina que se adhiere al monóxido de carbono en lugar del oxígeno o el dióxido de carbono. Las cantidades altas de este tipo de hemoglobina anormal impiden el movimiento normal de oxígeno por parte de la sangre (Dugdale, 2009).

La hemoglobina puede combinarse con monóxido de carbono en la misma proporción que con oxígeno, sin embargo la afinidad de la molécula de hemoglobina por el CO es de mucho mayor.

Esto significa que el monóxido de carbono se fijará a la hemoglobina aunque su concentración en el aire sea sumamente baja (figura 1.6.1). La carboxihemoglobina no puede fijar el oxígeno, por lo que no sirve para transportarlo (Sanford, 1981).

Figura 2.6.1 describe de manera general el proceso por el cual el monóxido de carbono desplaza al oxígeno.

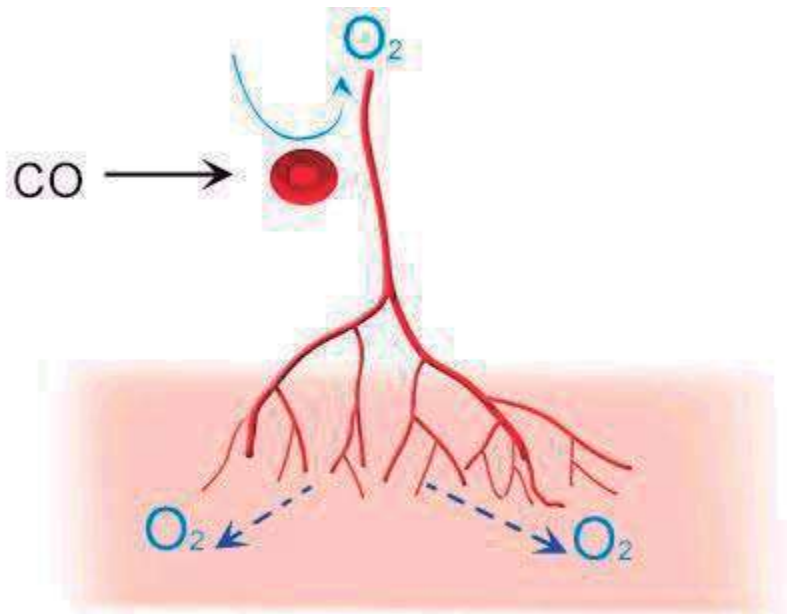


Figura 2.6.1 Sustitución del O_2 por CO

El cuerpo humano produce de forma continua pequeñas cantidades de CO , como uno de los productos finales del catabolismo de la hemoglobina y otros grupos hemo. De esta manera es normal que en un individuo sano exista una saturación de carboxihemoglobina del 0.4 - 0.7%, o que en situación de anemia hemolítica aumente la producción endógena de CO , llegando a una saturación de carboxihemoglobina del 4-6%.

El monóxido de carbono unido a la hemoglobina provoca una desviación a la izquierda de la curva de disociación de la hemoglobina. La curva de disociación

representa los cambios en la saturación de la hemoglobina de acuerdo a los cambios en la presión parcial de O₂. (Brandan, 2008).

Los primeros reflejos de la falta de oxígeno en el cuerpo se presentan en el cerebro donde se producen cefalea y sensaciones de pulsaciones en las sienes, seguidas de síncope, coma profundo, insuficiencia respiratoria y muerte. El diagnóstico clínico puede establecerse a través de una historia de exposición y la presencia de una coloración rosa cereza a nivel del lecho ungueal y en las membranas mucosas.

En la Ecuación 2.6.1 se muestra que la administración de oxígeno representa la medida terapéutica esencial y se basan en la ley de acción de masas, (Sanford, 1981).



2.6.1 Identificación de carboxihemoglobina

2.6.1.1 Técnicas químicas de orientación

Cierto número de reacciones químicas, fundadas en un mismo principio constituyen un dato de probabilidad acerca de la presencia de monóxido de carbono (CO) en sangre. Se trata la sangre con agentes hematinizantes o metahemoglobinizantes; cuando la sangre contiene oxihemoglobina, se produce un cambio de color a pardo achocolatado, formando grumos en ocasiones. Por el contrario la sangre que tiene carboxihemoglobina no cambia de color o lo hace muy lentamente (Calabuig, 1998).

❖ Ensayo de dilución

El ensayo de dilución consiste en preparar soluciones sanguíneas al 1% de muestra a analizar y de sangre normal. Se observa simultáneamente ambos tubos de ensayo con luz natural difusa. La sangre normal presenta color rojo amarillento, mientras la muestra, que contiene carboxihemoglobina, presenta color carminado neto. Este ensayo es seguro y práctico, es estable con concentraciones de carboxihemoglobina superiores al 20% (González, 2003).

❖ Ensayo alcalino

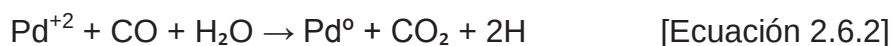
Se basa en la mayor estabilidad de la carboxihemoglobina con respecto a la hemoglobina en condiciones alcalinas similares.

Al utilizar hidróxido de carbono para presentar un medio básico la sangre normal presentará una coloración café verdosa, mientras que la sangre saturada con monóxido de carbono permanece inalterada durante cierto tiempo. Este ensayo ofrece un neto contraste y resulta positivo cuando la concentración de carboxihemoglobina es superior al 10% (González, 2003).

❖ Microdifusión

Se basa en el poder reductor del monóxido de carbono, el cual al ponerse en contacto con una solución de cloruro de paladio (PdCl_2), reacciona produciendo paladio. La reacción se realiza en una cámara de Conway, en donde se coloca la muestra de sangre y el agente liberador (ácido sulfúrico al 10%) en el compartimento externo, en el interno, el agente atrapante (PdCl_2). De tal manera que se produce la captación y oxidación del monóxido de carbono, forzándose la remoción completa del mismo al cabo de un tiempo y temperatura determinados (Facultad de Ciencias Exactas-UNLP, n.d.).

Es un método adecuado únicamente para la determinación de altos valores de carboxihemoglobina, ya que, cuando los valores están por debajo del 10%, esta técnica no permite una estimación válida. A continuación en la Ecuación 2.6.2 se muestra la reacción que se lleva a cabo durante esta técnica (Calabuig, 1998).



2.6.1.2 Técnicas instrumentales

En la actualidad existe una gran variedad de técnicas a disposición del toxicológico que abarcan desde los clásicos métodos no instrumentales, hasta los métodos instrumentales más sofisticados.

El análisis químico ha presentado en los últimos años un considerable desarrollo, caracterizado esencialmente por el empleo de instrumentos, capaces de medir propiedades físicas o químicas, que permiten la identificación y cuantificación de los compuestos químicos (Facultad de ciencias exactas-UNLP, n.d.).

❖ Cromatografía de gases

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

Por un lado la elevada presión de vapor del monóxido de carbono requiere de columnas y/o de programas que sean capaces de separar al analito de los gases utilizados como acarreador, helio o nitrógeno generalmente y de otros gases que pudiesen coexistir con el CO como el CO₂. Este inconveniente se subsana

utilizando columnas capilares y programas de corrida cromatográfica que trabajan comenzando a temperaturas subambiente, típicamente a -20°C . Los equipos requeridos para estas condiciones cromatográficas son muy poco frecuentes en laboratorios de toxicología.

Por otro lado, la detección de la señal de monóxido de carbono a la salida de la columna CG se realiza mediante dos metodologías posibles. Una forma es la utilización de una post columna con un catalizador y condiciones de hidrogenación adecuadas para transformar al monóxido de carbono cuantitativamente en metano, luego de los cuales este es medido por un detector común iónico de llama. La otra forma es la utilización de un detector de conductividad térmica. Ni el detector de conductividad térmica, ni el catalizador post columna son elementos comunes en un laboratorio dedicado a la toxicología (Facultad de ciencias exactas-UNLP, n.d.).

❖ Método espectrofotométrico

Está basado en la distinta localización de los máximos y mínimos de absorción de las 2 bandas correspondientes a los espectros de absorción de la oxihemoglobina y la carboxihemoglobina. El valor del cociente de las absorbancias correspondientes a las longitudes de onda de 576 y 560nm indica directamente el porcentaje de carboxihemoglobina en la sangre, esto utilizando el método de Heilmeyer (Calabuig, 1998).

El método de Heilmeyer se fundamenta en el hecho de que la sangre normal contiene varias formas de hemoglobina (la forma reducida, la forma oxidada y pequeñas cantidades de metahemoglobina), si un agente reductor como el hidrosulfito de sodio es agregado a la sangre, la forma oxigenada y la metahemoglobina son cuantitativamente convertidas a la forma reducida.

Figura 2.6.2 ilustra el porcentaje de saturación de monóxido de carbono en una muestra de sangre puede calcularse de la medida de la absorbancia a esa longitud de onda de la muestra saturada con monóxido de carbono (A), la muestra libre de monóxido de carbono (B) y la muestra sin tratar (C) luego de la reducción con hidrosulfito de sodio (Eichenberg, 2003.).

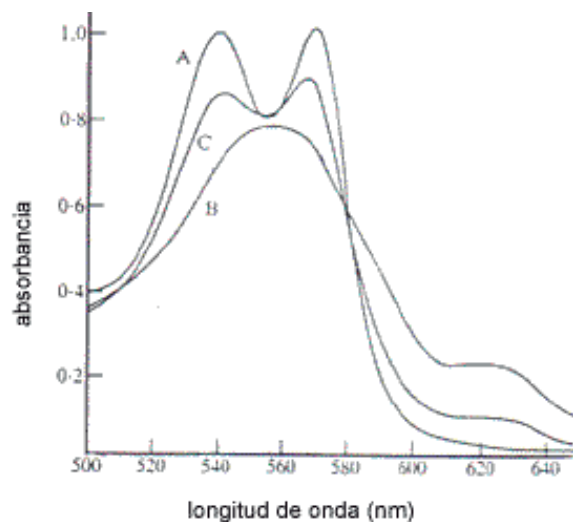


Figura 2.6.2 Espectros de absorción de (A) carboxihemoglobina, (B) hemoglobina reducida y (C) muestra de sangre de paciente intoxicado con monóxido de carbono, utilizando el método de Heilmeyer.

La carboxihemoglobina permanece sin modificarse aún cuando se ha realizado un tratamiento con hidrosulfito de sodio (Eichenberg, 2003).

Para mediciones de sangre saturada con CO, el método de espectrofotometría es una muy buena opción. Como muchos especímenes sanguíneos contienen metahemoglobina, es importante usar un método espectrofotométrico que no esté influenciado por la presencia de la metahemoglobina.

Para mediciones de COHb en líquidos sanguinolentos en cavidades torácica y abdominal, se debe tomar un cuidado especial. Kojima (1981), reportó que del 2.3-44.1% de COHb se logró detectar en fluidos de las cavidades torácicas de 7

víctimas sin exposición al fuego o al CO, mientras que la COHb contenida en los corazones fue sólo de 0.3-6%.

Los altos contenidos de carboxihemoglobina en fluidos de cavidades torácicas son considerados debido a una producción de COHb después de la muerte; esta última puede ser producida por la descomposición de la hemoglobina y de la mioglobina durante la putrefacción. En particular en fluidos de cavidades torácicas de personas que han muerto por ahogamiento.

La sangre putrefacta también contiene hemoglobina sulfurada (sulf-Hb), que no reacciona con el hidrosulfito de sodio, en conjunto con la COHb producida después de la muerte; la solución hemolizada que se analizará se convierte en Hb reducida, COHb y sulf-Hb, y de esta manera no es adecuada para una medición de COHb por espectrofotometría debido a que muestra valores de carboxihemoglobina menores al valor real (Susuki et al. 2002).

En la figura 2.6.3 se muestra una gráfica que ilustra los espectrogramas obtenidos a partir del método propuesto por Keizo Sato. El espectrograma marcado como Número 1 corresponde al estándar de oxihemoglobina y su máxima absorbancia y el estándar de carboxihemoglobina que muestra claramente la diferencia entre un espectrograma y otro, marcado como Número 2.

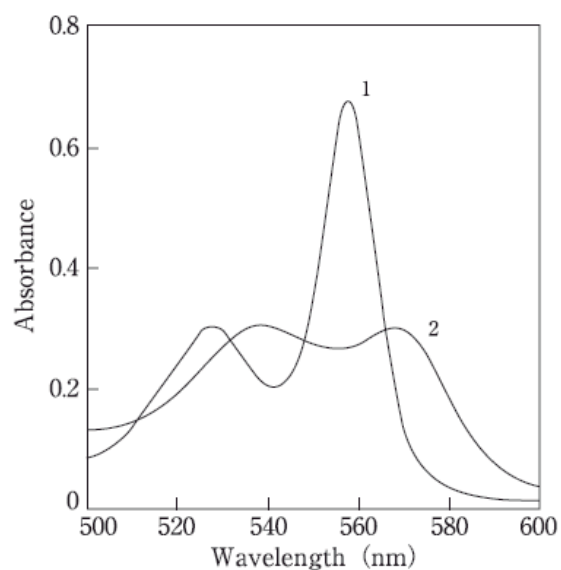


Figura 2.6.3 Espectros de absorción de (1) oxihemoglobina y (2) carboxihemoglobina, utilizando el método de Keizo Sato.

3. ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes históricos sobre la Hemoglobina

La hemoglobina es una de las proteínas más estudiadas y mejor caracterizadas. La gran variedad de aspectos científicos que incluye y la importancia que juega en la biología, hace que aún hoy en día aparezcan sorprendentes descubrimientos acerca de esta molécula, tales como las nuevas globinas, neuroglobina y citoglobina y las interacciones con el óxido nítrico, aunque los primeros estudios científicos se hayan realizado desde el siglo XIX. Así mismo, el estudio de las hemoglobinopatías constituye un gran reto para la medicina moderna (Peñuela, 2005).

Una de las funciones vitales de los eritrocitos es su participación en el intercambio gaseoso de oxígeno y dióxido de carbono entre los pulmones y los tejidos. La hemoglobina (Hb), es el componente fundamental de este proceso. Las hemoglobinas son proteínas globulares, presentes en los hematíes en altas concentraciones, que fijan oxígeno en los pulmones y lo transportan por la sangre hacia los tejidos y células que rodean el lecho capilar del sistema vascular. Al volver a los pulmones, desde la red de capilares, la hemoglobina actúa como transportador de CO₂ y de protones (Peñuela, 2005).

La hemoglobina ha jugado un papel histórico en la química, la biología y la medicina, en 1849 se convirtió en la primera proteína en ser cristalizada y asociada con una función fisiológica específica. La diferencia morfológica entre los cristales de hemoglobina de diferentes organismos proporcionó por primera vez evidencia contundente acerca de la especificidad en la expresión proteica entre las especies. Además, se encuentra entre las primeras proteínas cuyo peso molecular fue determinado correctamente. En 1958 se convirtió en la primera proteína eucariota en ser sintetizada in vitro, trabajo que permitió comprobar que el mecanismo de síntesis

proteica en eucariotas es similar al de *Escherichia coli*. Su estructura se estableció en 1960. El ARN mensajero de la globina fue el primer mensajero eucariota en ser aislado y en tener una secuencia nucleótida determinada (Peñuela, 2005).

3.2 Antecedentes históricos sobre la carboxihemoglobina

Un grupo de científicos japoneses describieron un método simple para la determinación de carboxihemoglobina mediante espectrofotometría.

En donde la sangre se disolvía en una solución de carbonato de sodio y el porcentaje de COHb era calculado de valores de absorbancia de 532 y 558 nm, medidos después de haberse agregado hidróxido de sodio, lo que hacía a la solución completamente clara (Katsumata et al, 1982).

En 1984 Theodore J. Siek y Fredrick Rieders desarrollaron un método espectrofotométrico para medir carboxihemoglobina cuando existen otros pigmentos de hemoglobina, como la metahemoglobina, hemoglobina reducida y sulfahemoglobina. Utilizando las absorbancias obtenidas en los puntos isosbéticos, se elaboraron ecuaciones para medir la oxihemoglobina, la oxihemoglobina reducida y la carboxihemoglobina.

Así mismo, diseñaron un estándar de carboxihemoglobina; utilizando un tubo de tapa rosca conteniendo de 3 a 10 mL de sangre y rociándola con CO por unos segundos e inmediatamente cerrar el tubo y rotarlo por unos minutos. El cambio de coloración a rojo cereza se observó cuando la saturación de monóxido de carbono es cercana al 100%.

Este método mostró ser certero, preciso y confiable con sangre fresca; mientras que en sangres desnaturalizadas se presentó una disminución en la precisión, sin embargo la confiabilidad para determinar COHb se mantuvo (Siek y Rieders, 1984).

Goldbau et al, describieron un método para la cuantificación de monóxido de carbono por cromatografía de gases acoplado a un detector de conductividad térmica. El método se comparó con las técnicas estándar de cromatografía de gases y espectrofotometría para la determinación de monóxido de carbono. Concluyendo que este método es más estable, principalmente para muestras en estado de descomposición (Goldbau et al, 1986).

Malheiros et al, realizaron un estudio para la determinación de COHb mediante un método espectrofotométrico; en donde determinaron lo siguiente (Malheiros et al, 1998):

- La COHb es estable en muestras de sangre almacenadas a 4°C por cerca de seis meses.
- La cantidad de hemoglobina y de lípidos en la sangre no interfiere con la medición espectrofotométrica de la COHb.
- Se requiere de factores de calibración específicos para el espectrofotómetro utilizado y así poder obtener resultados confiables.

En 1999 se desarrolló un método para la preparación de estándares de carboxihemoglobina, dichos estándares fueron estables por más de cuatro meses, manteniéndose dentro de los límites aceptables.

El control negativo para CO se preparó depositando sangre fresca en un matraz volumétrico en donde se aplicó un flujo de 1mL/min de nitrógeno para purificarlo durante 2 o 3 minutos.

El control positivo para CO se preparó depositando sangre fresca en un matraz volumétrico en donde se aplicó un flujo de monóxido de carbono para purificarlo durante 20 minutos.

Ambos controles positivo y negativo, se analizaron en un CO-oxímetro realizando una serie de 10 mediciones, para obtener un promedio de la concentración carboxihemoglobina y su desviación estándar (Canfield, Smith, Ritter, 1999).

En el 2002 Lewis et al, identifican que la carboxihemoglobina tiene una máxima absorbancia a los 540 nm, y que existe un punto isobéptico a los 579 nm en donde absorben diversas especies de hemoglobina (oxihemoglobina, carboxihemoglobina, entre otras). Utilizaron las absorbancias obtenidas a 540 nm y 579 nm para determinar el porcentaje de carboxihemoglobina (Lewis et al, 2002).

El Dr. Sánchez, realizó una investigación en cadáveres calcinados determinando que un punto de interés es saber si la víctima ha respirado en el foco del incendio.

La presencia de carboxihemoglobina en sangre puede dar lugar a resultados equívocos, en víctimas que sufrieron accidentes de aviación, algunos casos de explosiones u otros tipos de deflagraciones en donde la muerte se ha producido de una forma rápida

Otros autores señalan que dependiendo del espacio físico donde se haya producido el incendio, pueden variar las concentraciones de carboxihemoglobina en la sangre. Basados en un estudio de 21 casos de suicidios por fuego, en donde se encontraron bajas concentraciones de carboxihemoglobina (3 y 30%) considerando espacios abiertos; mientras que en espacios cerrados, como vehículos se obtuvieron concentraciones de CO de entre el 34 y el 87%. De los 21 casos, en 18 encuentran partículas de carbón en vías respiratorias, incluso en algunos de los cadáveres con concentraciones de monóxido de carbono bajas.

De igual manera, un estudio de 28 accidentes automovilísticos en los cuales se ocasionó un incendio, indica que en caso de encontrar concentraciones de carboxihemoglobina mayores al 30% se sugiere que la causa de muerte se produjo por la inhalación de CO, mientras que cuando las concentraciones son menores al 20% sugiere otra causa de muerte (Sánchez. 2009).

En el año 2010, Stephan G. Walch, et al, validaron un método para determinar COHb por medio de cromatografía de gases, en donde las muestras fueron analizadas mediante la técnica de espectrofotometría UV/Vis, por el método planteado por Heilmeyer; utilizando 20 muestras de casos forenses con sospecha de intoxicación con CO (Walch, Lachenmeier, Sohnius, Madea y Musshoff, 2010).

3.3 Referencias en la historia de intoxicaciones con monóxido de carbono

A continuación se describen algunos antecedentes históricos sobre las intoxicaciones por monóxido de carbono (Jain, 1990).

- Aristóteles, (siglo III AC), “los humos del carbón producen sensación de cabeza pesada y muerte”.
- Cicerón (106–43 AC) Roma, Los humos del carbón fueron utilizados para suicidio y ejecución.
- Paracelso (1493–1541), escribió el primer tratado en enfermedades de los mineros.
- Van Helmot (1577–1644), experimentó en sí mismo la intoxicación con “gas de madera” proveniente de una olla de carbón y casi murió.
- Rammazzini (1633-1714), escribió De Morbis Artificum (enfermedad de los mineros) y señaló que los daños provenían de quemar carbón.
- Clayton (1688), destiló gas del carbón.
- Priestly (1772), describió un gas combustible que se quemaba con una flama azul (monóxido de carbono).

- Harmant (1775), en Francia describe el primer envenenamiento con gas de carbón.
- Cruickshank (1800), demostró que el monóxido de carbono es un óxido que puede ser convertido a CO₂ explotándolo con oxígeno.
- LeBlanc (1842), identificó al CO como la sustancia tóxica en el gas del carbón.
- Chenot (1854), fue el primero en dar la explicación del mecanismo de acción del CO.
- Claude Bernard (1857), demostró que el CO produce hipoxia al combinarse de manera reversible con la hemoglobina.
- Hoppe (1875), en Alemania demostró que el CO cambia el color normal de la sangre por un rojo brillante.
- Linus y Limousin (1868), fueron los primeros en tratar una oxigenoterapia para la intoxicación con CO.
- Saint-Martin y Nicloux (1898), fueron los primeros en demostrar que existía monóxido de carbono endógeno.
- Mosso (1901) sugirió el uso de una oxigenoterapia hiperbárica para la intoxicación con CO.
- End y Long (1942) trataron intoxicaciones con CO en animales experimentales usando oxigenoterapia hiperbárica.
- Smith y Sharp (1969) realizaron el primer uso clínico de la oxigenoterapia hiperbárica en la intoxicación con CO.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estandarizar e implementar un método para la cuantificación de monóxido de carbono en muestras de sangre de cadáveres de personas fallecidas por intoxicación con CO, mediante la técnica instrumental de espectrofotometría UV-Vis, con el método descrito por Keizo Sato.

4.2 Objetivos particulares

- Estandarizar e Implementar un método para la cuantificación de monóxido de carbono por medio de la técnica instrumental de espectrofotometría UV/Vis, en muestras de sangre de cadáveres de personas fallecidas por intoxicación con CO.
- Desarrollar un control positivo de COHb, que auxilie a la cuantificación de CO en muestras de sangre de cadáveres de personas fallecidas por intoxicación con CO

5. HIPÓTESIS

Existen diversos métodos de ensayo cualitativos mediante los cuales se puede determinar la presencia de COHb en sangre, sin embargo, a través del uso de un instrumento de medición como el espectrofotómetro UV/Vis, es posible cuantificar la COHb con una alta exactitud en muestras de sangre de personas o cadáveres de personas fallecidas por intoxicación con CO, de tal manera que se logren resolver casos de interés forense, coadyuvando en la impartición de justicia.

6. JUSTIFICACIÓN

Bajas concentraciones de monóxido de carbono llegan a bloquear gran parte de la hemoglobina, debido a la alta afinidad por el monóxido de carbono (250 – 300 veces mayor que el O₂). El efecto tóxico del CO es debido fundamentalmente a la disminución del oxígeno.

Debido a las características físicas del monóxido de carbono, da origen a un gran número de intoxicaciones accidentales, al no darse cuenta la víctima del peligro que le amenaza.

En casos en los cuales se presentan delitos de homicidios y suicidios relacionados a incendios, es difícil para el perito médico forense establecer la causa de muerte mediante los resultados cualitativos aportados por el Perito Químico Forense.

En el Laboratorio de Química Forense de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Michoacán, se viene realizando una serie de técnicas cualitativas para la identificación de COHb en muestras de sangre, de cadáveres que al parecer fueron intoxicadas por este gas. Por lo que es de gran importancia llevar a cabo la cuantificación de COHb, para establecer concentraciones que contribuyan con la determinación de la causa de muerte.

De tal manera, que el desarrollo de técnicas instrumentales como la espectrofotometría UV/Vis se considera crítico para comprobar la validez de los resultados.

7. METODOLOGÍA Y EXPERIMENTACIÓN

7.1 Material, reactivos y equipo

Para las pruebas de cualitativas se utilizó el siguiente material:

MATERIAL

Cámara de Conway

Caja de petri

Papel filtro

Pipetas

REACTIVOS

Cloruro de paladio (PdCl_2)

Hidróxido de sodio (NaOH) al 10%

Acido Sulfúrico (H_2SO_4) al 10%

Sangre fresca

Control positivo desarrollado

Para la síntesis de monóxido de carbono y preparación del control positivo de referencia, además de la medición del porcentaje de éste se utilizó el siguiente material:

EQUIPO

Campana de Extracción. Marca Provent

Espectrofotómetro UV-Vis. Marca Perkin Elmer instruments, modelo lambda 25

MATERIAL

Tubos de ensaye

Matraz Erlenmeyer 250 mL marca Kimax

Matraz Erlenmeyer 50 mL marca Kimax
Embudo de Separación 60 mL marca Pirex
Matraz Balón de Destilación 250 mL marca Pirex
Tubo de vidrio de diámetro de 0.5 mm
Micropipeta Brand – Trasnsferpette. 10-100 μL .
Micropipeta Brand – Trasnsferpette. 0.5/20 μL
Micropipeta Brand – Trasnsferpette. 100-1000 μL

REACTIVOS

Acido Fórmico (HCOOH) concentrado.
Acido Sulfúrico (H_2SO_4) concentrado
Hidróxido de Sodio (NaOH) al 10%
Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 0.1%
Hidróxido de sodio (NaOH) 5M
Hidrosulfito de sodio (Ditionita, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}_4$)
Agua Destilada
Sangre humana fresca

7.2 Preparación del control positivo de referencia mediante la síntesis de monóxido de carbono

Se agregaron 20 mL de ácido sulfúrico dentro del matraz balón y a su vez se colocó en la base metálica. En la parte superior del matraz se adaptó un embudo de separación conteniendo 2 mL de ácido fórmico.

Posteriormente, se agregaron 150 mL de hidróxido de sodio al 10% a un matraz Erlenmeyer de 250 mL y al de 25 mL se le adicionaron 20 mL de sangre fresca. Los tubos de vidrio encargados de unir a los matraces entre sí, se moldearon previamente tal como se muestra en la figura 7.1

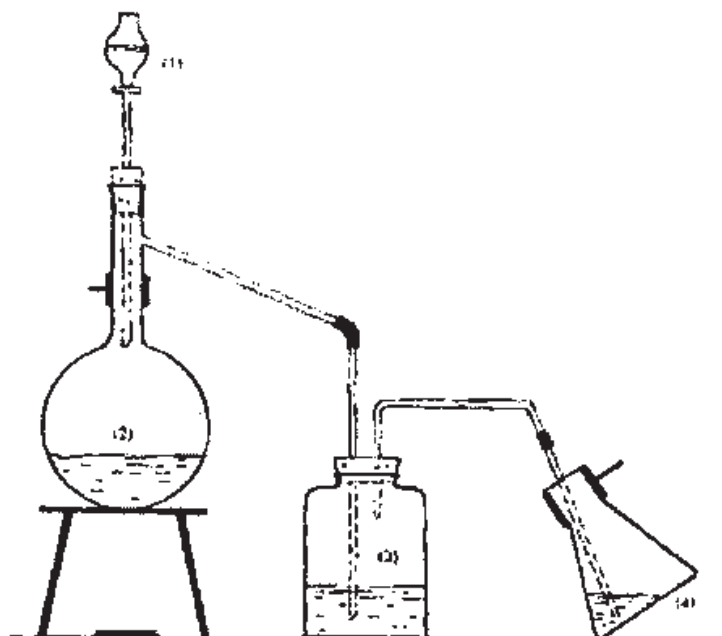


Figura 7.1 Aparato de laboratorio en el que se basó este proyecto para saturar sangre con monóxido de carbono (control positivo de referencia).

La reacción que se lleva a cabo entre el ácido sulfúrico y el ácido fórmico para obtener el monóxido de carbono es la siguiente (Ecuación 7.1):



El ácido fórmico se hace reaccionar con el ácido sulfúrico lentamente e instantáneamente se inicia el burbujeo dentro del matraz balón, el monóxido de carbono obtenido (ver reacción previa) se desplaza a través del tubo de vidrio para así de forma casi simultánea iniciar también el burbujeo dentro del matraz que contiene la sangre. Se deja la sangre burbujeando por 50 minutos hasta lograr su saturación con monóxido de carbono.

En el diagrama de flujo 7.1 se ilustra el proceso de obtención del control positivo de referencia.

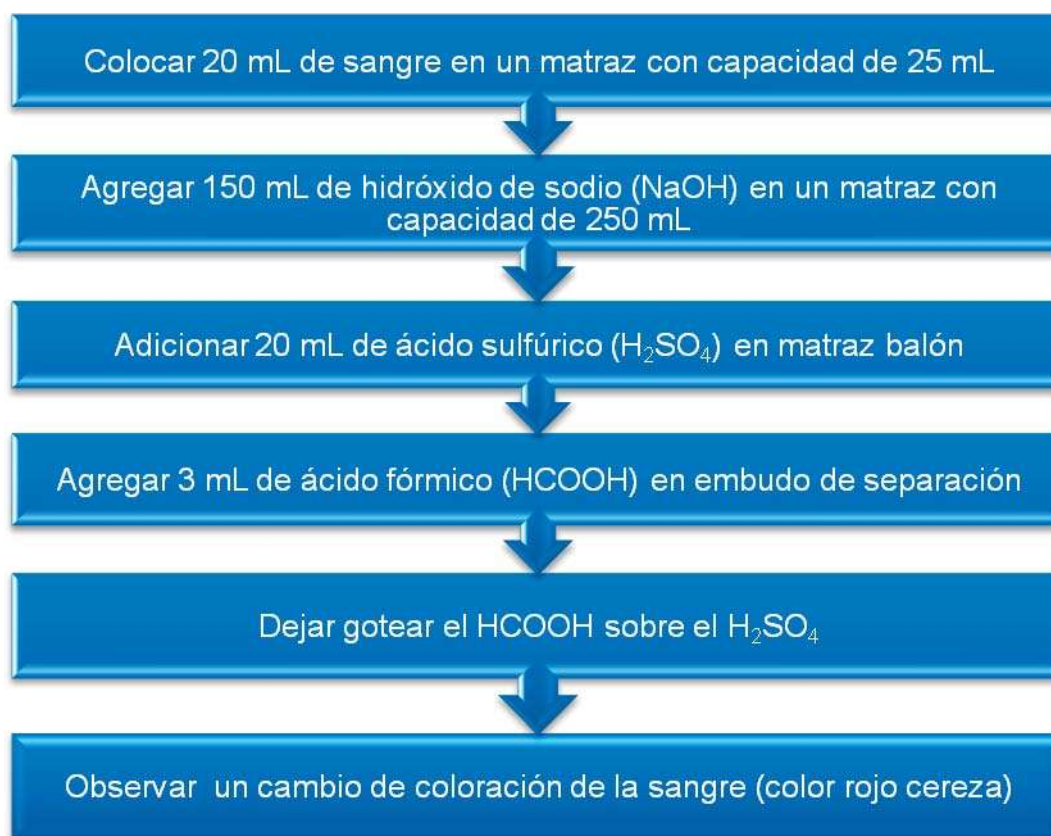


Diagrama de flujo 7.1 Preparación del control positivo de COHb de referencia.

7.3 Pruebas de orientación

- Ensayo alcalino

La técnica del ensayo alcalino se realizó colocando sobre un papel filtro dos muestras de sangre, unas gotas de un control negativo en un extremo y unas gotas del control positivo al otro extremo.

Se le agregan unas gotas de NaOH y después de unos segundos se observó si existía un cambio de color.

- Microdifusión

Esta prueba se realizó colocando 1 mL de sangre y 1 mL de ácido sulfúrico al 10% en el compartimento exterior de la cámara de conway y en el compartimento interior se agregaron 2 mL de solución de cloruro de paladio. Después se cubrió la cámara por un periodo de 60 minutos a temperatura ambiente y se observó la formación de una película metálica en el compartimento interno de la cámara.

7.4 Procedimiento para cuantificación de carboxihemoglobina

Una vez preparado el control positivo es necesario conocer la concentración de carboxihemoglobina, para esto se utilizan los reactivos hidrosulfito de sodio (ditiotionita), carbonato de sodio, hidróxido de sodio, y un espectrofotómetro UV-Vis.

En un tubo de ensaye conteniendo 2.5 mL de Na_2CO_3 al 0.1%, se adicionan 2 mg de hidrosulfito de sodio, se debe agitar hasta disolución completa. Posteriormente, se agregan 10 μL de sangre y 0.2 mL de NaOH 5M hasta obtener una mezcla homogénea.

Transcurridos 5 minutos, se miden las absorbancias a las longitudes de onda de 558 nm y 532.7 nm, en el espectrofotómetro UV-Vis.

Basados en los espectrogramas obtenidos de la oxihemoglobina y la carboxihemoglobina, se establecieron las longitudes de onda utilizadas en la medición. La longitud de onda de 558.0 nm es el pico máximo de absorbancia del espectro de la oxihemoglobina y la longitud de onda de 532.7 nm es el punto isobéptico entre ambos espectros (Ver imagen 2.6.3).

Se calcula el porcentaje de COHb mediante la siguiente ecuación (Ecuación 7.2):

$$\text{COHb \%} = (2.44 - A_{558} / A_{532.7}) \times 67 \quad [\text{Ecuación 7.2}]$$

En el diagrama de flujo 7.2 se ilustra el procedimiento para la cuantificación de carboxihemoglobina.

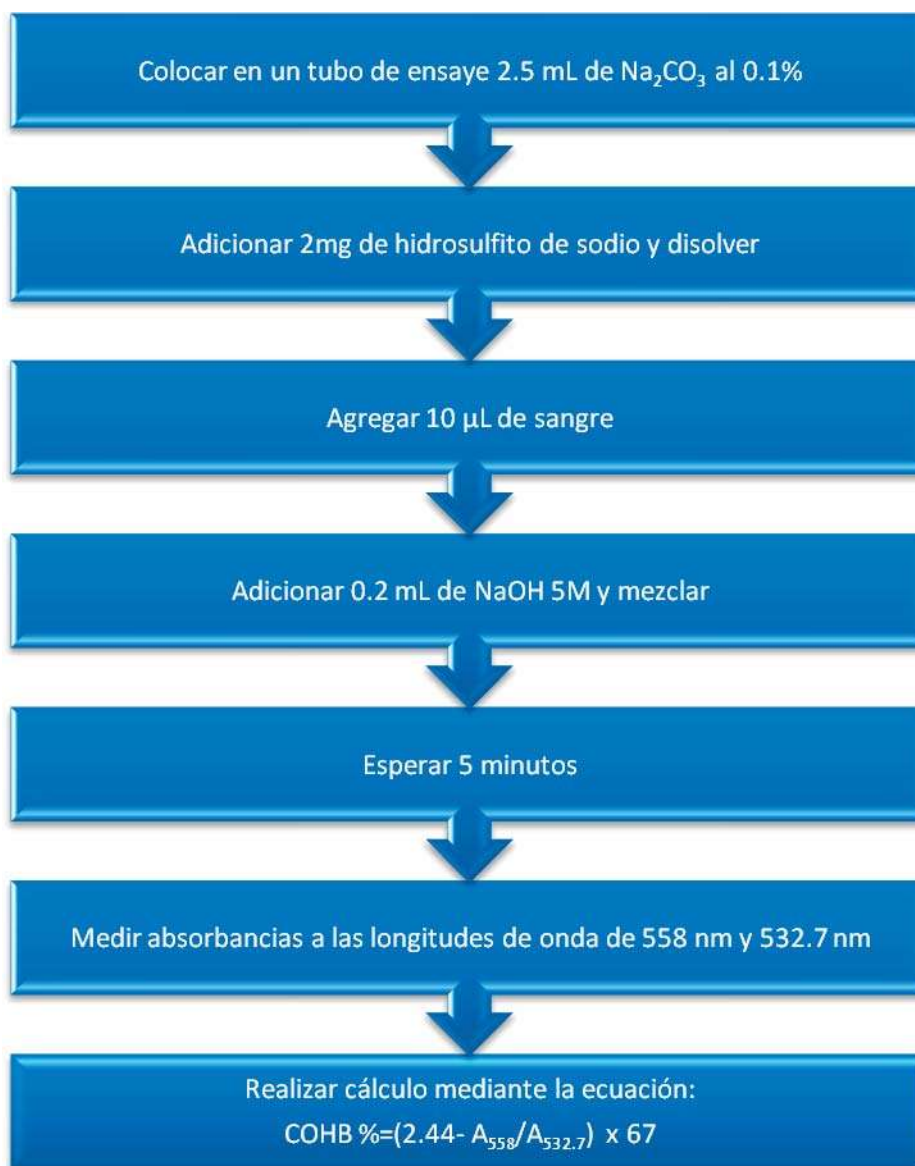


Diagrama de flujo 7.2 Metodología para la cuantificación de la COHb.

7.5 Pruebas estadísticas

Para analizar los resultados obtenidos, fue necesario el uso de herramientas estadísticas para la evaluación de los mismos.

- Prueba de reproducibilidad

La reproducibilidad es uno de los principios esenciales del método científico, y se refiere a la capacidad que tiene una prueba de ser reproducida o replicada.

Formalmente se refiere a la proximidad entre los resultados de mediciones de un mismo mesurando, realizadas bajo distintas condiciones de medición (Guía para Validación de Métodos de Ensayo, 2003).

Precisión bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en diferentes laboratorios, por diferentes operadores, usando diferentes equipos (Molina, 2010).

El desarrollo de esta prueba se llevó a cabo con dos analistas, en donde cada uno de los analistas realizó la cuantificación de COHb a través de 10 repeticiones y de acuerdo al procedimiento establecido anteriormente, para finalmente con los valores obtenidos determinar el promedio y hacer la comparación entre ambos analistas.

- Prueba de t de student

Es una distribución continua que desempeña un papel fundamental en la estadística, sobre todo cuando se trabaja con pequeñas muestras. Esta prueba estadística se requiere para obtener las diferencias entre dos medias muestrales (Vargas, 1995).

Mediante programas de apoyo estadístico se calculó la t de student.

La interpretación de este estadístico se define por el valor de “p”, el cual debe ser mayor a 0.05 ($p > 0.05$) para considerar que no hay diferencia significativa entre cada uno de los grupos de estudio.

Debido a que la identificación de COHb es un análisis de la presencia a partir de un límite de detección, se utiliza el análisis estadístico asintótico unilateral para el estadígrafo de prueba t.

Es necesario formular una hipótesis nula (H_0), que dice que no existe diferencia significativa entre los datos de los analistas 1 y 2, y la hipótesis alternativa (H_a), que dice que sí existe diferencia significativa entre ambos analistas.

8. RESULTADOS

8.1 Preparación del control positivo de referencia de referencia

La figura 8.1.1 muestra el dispositivo utilizado para preparar el control positivo de carboxihemoglobina. Se observa el ácido sulfúrico en el interior del matraz balón y a su vez los matraces Erlenmeyer que contendrán el hidróxido de sodio y la sangre, comunicados entre sí mediante el tubo de vidrio moldeado.



Figura 8.1.1 Dispositivo para la formación de monóxido de carbono

En la siguiente figura se muestra la reacción ocurrida entre el ácido fórmico y ácido sulfúrico en el interior del matraz balón. Observando un evidente burbujeo.

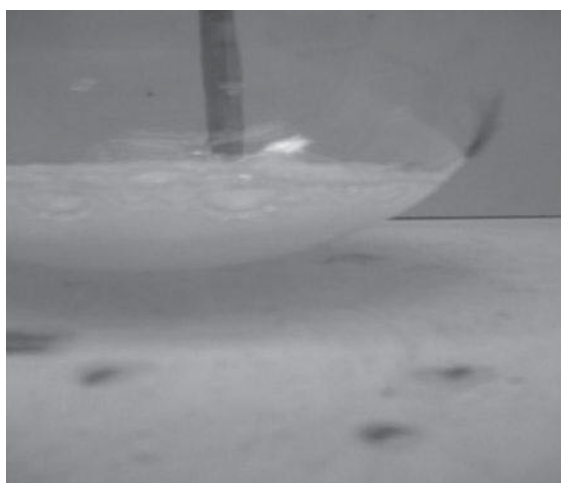


Figura 8.1.2 Reacción del ácido sulfúrico con el ácido fórmico

En la figura 8.1.3 se muestra el efecto ocasionado en la sangre por el contacto con el CO. La saturación de la sangre con CO, se produce por el desplazamiento del oxígeno mediante su interacción con la hemoglobina.



Figura 8.1.3 cambio de coloración de la sangre saturada

El CO produce un cambio de coloración en la sangre, de rojo carmín a rojo cereza, mismo que se muestra en la siguiente figura.



Figura 8.1.4 Imagen donde se muestra la diferencia de coloración de la sangre antes de iniciar el proceso de saturación con CO (derecha) y después de la saturación con CO (izquierda).

8.2 pruebas de orientación

Ensayo alcalino

En la figura 8.2.1 se muestra el resultado de la prueba de alcalinidad, donde se comprueba que la carboxihemoglobina es más estable que la oxihemoglobina ante un medio alcalino. Esta última desarrolla una coloración café, producto de la oxidación.



Figura 8.2.1 imagen donde se muestra el desarrollo de una coloración café en presencia de Hb del ensayo alcalino.

Microdifusión

La imagen 8.2.2 muestra una prueba de microdifusión positiva, se puede observar la película metálica que se forma en la superficie de la solución de cloruro de paladio del compartimento interno de la cámara.

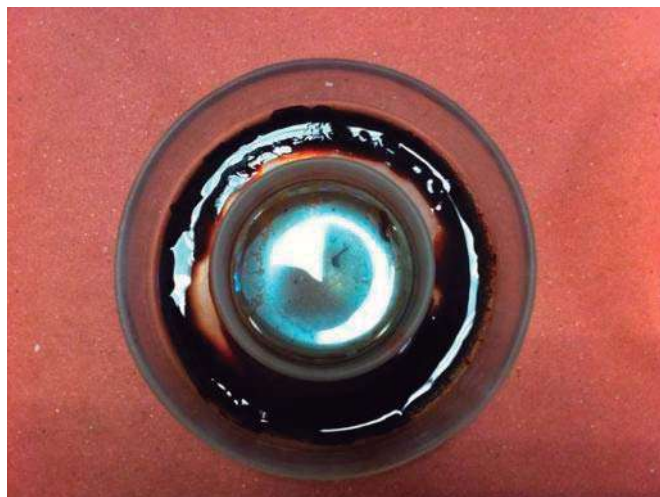


Figura 8.2.2 prueba de PdCl_2 positiva

A diferencia de una prueba positiva, en la figura 8.2.3 se puede observar el resultado de una prueba negativa donde no se forma la película metálica.



Figura 8.2.3 prueba negativa de PdCl_2

8.3 Medición del porcentaje de carboxihemoglobina en el control positivo

Se utilizó el método elaborado por Keizo Sato para la cuantificación de CO en sangre.

Para poder realizar la cuantificación del monóxido de carbono en la sangre, fue necesario dejar reposar la sangre al menos 24 horas para lograr la estabilización de la carboxihemoglobina.

Después de haber pasado el tiempo necesario para poder realizar la medición de monóxido de carbono en la sangre, se continuó con el procedimiento ya descrito en la sección de material y métodos (página 51).

El espectrofotómetro UV-Vis se calibró, para verificar el funcionamiento adecuado del instrumento. De manera que los resultados son confiables.

Después de preparar la solución de carbonato de sodio, la ditionita, el control positivo e hidróxido de sodio, descrita en el diagrama de flujo 7.1, se realizó la medición de nuestro control obteniendo en promedio una concentración de 61% de carboxihemoglobina.

Como se mencionó anteriormente un ser humano también tiene niveles de monóxido de carbono en su sangre, como uno de los productos finales del catabolismo de la hemoglobina y otros grupos hemo.

Por lo tanto para valorar la veracidad del método se realizaron mediciones tanto con sangre saturada con CO (control positivo), como en sangre de un joven deportista saludable (control negativo).

Figura 8.2.1 muestra que en el control negativo se obtuvo un porcentaje de 4% de carboxihemoglobina, y posteriormente, se llevó a cabo la prueba de reproducibilidad donde se obtuvieron resultados semejantes con ambos analistas (3.0% para el analista 1 y 4.0% para el analista 2)

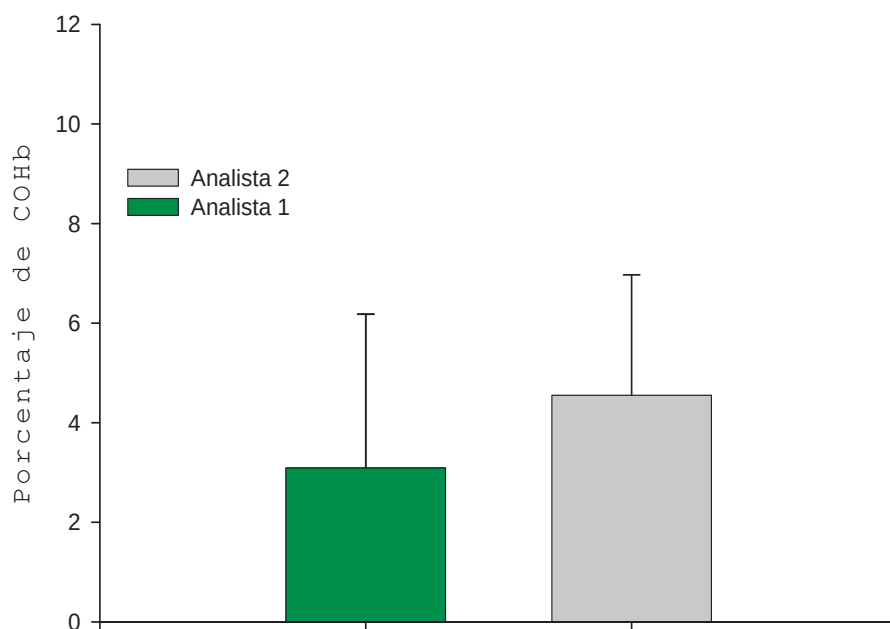


Figura 8.2.1. Porcentaje de COHb en control negativo

Tabla 8.2.1 muestra los datos obtenidos en la realización de una prueba t de student a un control negativo de carboxihemoglobina.

Tabla 8.2.1 Prueba t de student de 2 grupos de mediciones de un control negativo de COHb realizada por 2 analistas.

Control Negativo	Analista 1	Analista 2
Media	4.05036982	3.09015932
Varianza	5.84873274	9.54281579
Observaciones	10	10
Varianza agrupada	0.16423076	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	1.28377079	
P(T<=t) una cola	0.11564331	
Valor crítico de t (una cola)	1.83311292	
P(T<=t) dos colas	0.23128662	
Valor crítico de t (dos colas)	2.26215716	

Para esta prueba la variable de interés a considerar es el valor de $P(T \leq t)$ una cola. Debido a que el resultado obtenido de $P(T \leq t)$ una cola es mayor a 0.05 se concluye que no existe diferencia significativa entre ambos analistas.

Para el control positivo, se obtuvo un valor promedio del porcentaje de COHb de 61%. Enseguida se realizó la prueba de reproducibilidad entre dos analistas para determinar las diferencias entre ambos. Al aplicar una prueba t de student se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos analistas y se acepta la hipótesis nula, resultado que se muestra en la siguiente gráfica.

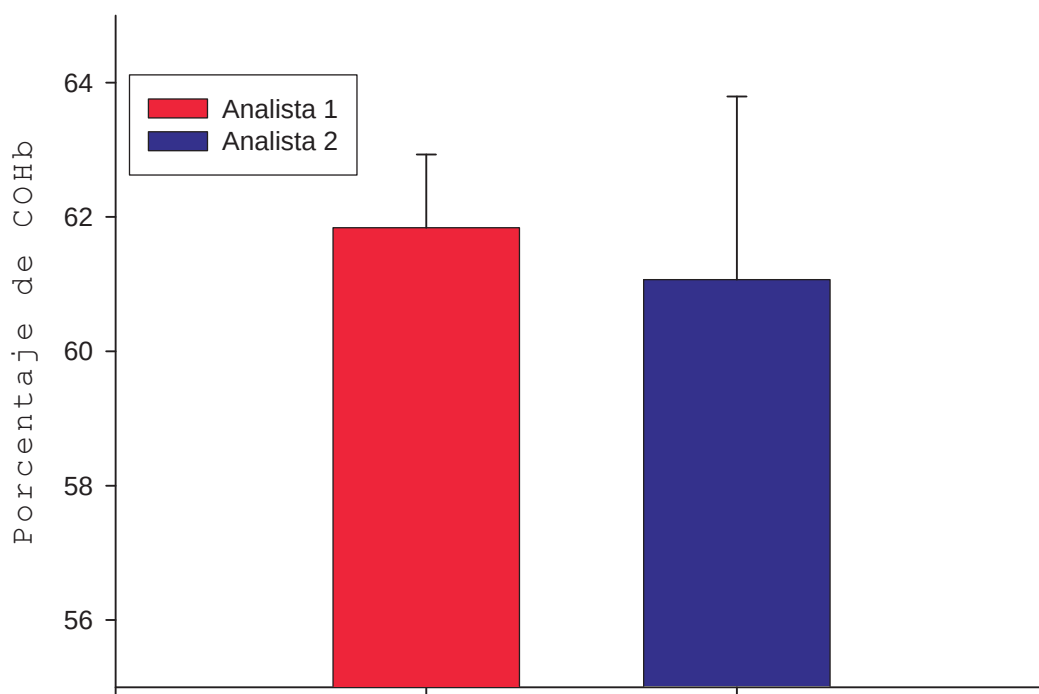


Figura 2.2.2 Prueba de reproducibilidad

Los promedios de los porcentajes obtenidos fueron de 61.83% para el analista número 1 y de 61.04% para el analista número 2.

En realidad las variaciones existentes entre ambos analistas son mínimas. Esto demuestra que la técnica es confiable.

En la tabla 8.2.2 se muestran los resultados obtenidos de la prueba t aplicada al control positivo por dos analistas.

Tabla 8.2.2 Prueba t de student de 2 grupos de mediciones de un control positivo de COHb realizada por 2 analistas.

Prueba t	Analista 1	Analista 2
Media	61.06789019	61.83897179
Varianza	7.429057972	1.190873813
Observaciones	10	10
Varianza agrupada	4.309965892	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	0.830516803	
P(T<=t) una cola	0.208563463	
Valor crítico de t (una cola)	1.734063592	
P(T<=t) dos colas	0.417126927	
Valor crítico de t (dos colas)	2.100922037	

9. DISCUSIÓN

Las técnicas espectrofotométricas se basan en la capacidad que tienen las moléculas y los átomos de absorber radiaciones de diferente longitud de onda (λ), característica para cada sustancia, utilizando la energía de dichas radiaciones para producir cambios energéticos en su estructura. (Calabuig, 1998)

La carboxihemoglobina es una forma anormal de hemoglobina que se adhiere al monóxido de carbono en lugar del oxígeno o el dióxido de carbono. Las cantidades altas de este tipo de hemoglobina anormal impiden el movimiento normal de oxígeno por parte de la sangre. (Dugdale, 2009)

En el laboratorio de Química y Genética Forense de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Michoacán, se aplica una serie de técnicas cualitativas para la determinación de monóxido de carbono, motivo por el cual se decidió iniciar este trabajo, con el objeto de implementar una técnica cuantitativa mediante el método de espectrofotometría UV/Vis que permita establecer las concentraciones de carboxihemoglobina en muestras hemáticas de cadáveres al parecer intoxicadas con monóxido de carbono.

Por otro lado, la toxicidad del monóxido de carbono depende tanto de la concentración del gas en el aire como del tiempo de exposición a éste. Una concentración del 50 % o más de COHb de acuerdo a la literatura es considerado mortal para un ser humano (susuki et al, 2002).

Debido a la dificultad para obtener un estándar de referencia de carboxihemoglobina comercial, se decidió llevar a cabo el desarrollo de un control positivo de carboxihemoglobina, éste con una concentración de 61% de COHb. Este porcentaje de carboxihemoglobina se determinó mediante la técnica de espectrofotometría de UV/Vis.

Por otro lado, considerando que para la validación del método era necesario determinar ciertos parámetros estadísticos como la reproducibilidad, límite de detección, etc. Se desarrolló otro control positivo con una concentración de 61% de COHb.

Para confirmar la concentración de COHb del control positivo que se desarrolló en el laboratorio, se llevó a cabo la prueba de Reproducibilidad por dos analistas, de acuerdo a la guía de EURACHEM, en donde no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos analistas.

Así mismo, la realización de varias pruebas piloto por el método establecido en la bibliografía bajo las mismas condiciones, dio lugar a diversas modificaciones del método para lograr obtener el control positivo de referencia de carboxihemoglobina. Siendo uno de los principales cambios, el mantener una válvula de escape para la salida de los gases producidos, evitando con ello el aumento de la presión en el sistema.

En 1999 Canfield et al, propusieron un método para la preparación de un estándar de carboxihemoglobina. Este estándar mantenía una estabilidad de aproximadamente 4 meses, en comparación con los estándares comerciales que sólo permanecían estables durante aproximadamente un mes. Mientras que Malheiros et al, concluyeron que la estabilidad de un estándar podía ser estable hasta por 6 meses preservado a una temperatura de 4°C.

De igual forma, el control positivo de COHb, presentó una estabilidad aproximada de 4 a 6 meses. El principal indicativo de su degradación fue una disminución en la concentración de COHb.

Inicialmente en este proyecto se venía utilizando un método para la determinación del porcentaje de carboxihemoglobina, donde se empleaba hidrosulfito de sodio y agua destilada, para crear una curva de calibración, a partir de diluciones de un

estándar de referencia de concentración conocida. Debido a la dificultad para realizar mediciones precisas de la muestra de sangre, se decidió sustituirlo por el descrito por Keizo Sato, en el 2005.

Fue de esta manera que se desarrolló este método donde a partir de ácido sulfúrico y ácido fórmico, se formó el monóxido de carbono y con el sistema implementado, se llegó a saturar la sangre para obtener el control positivo de referencia.

Cabe mencionar que en el método descrito por Keizo Sato, también utiliza el hidrosulfito de sodio para reducir la metahemoglobina, evitando con ello, la presencia de interferencias al realizar las mediciones de la COHb.

En los espectros de absorción de los controles positivo y negativo aparece la longitud de onda a la cual ambos espectros se cortan, denominado punto isosbético. Este punto isosbético fue reportado en trabajos previos de Susuki, et al, cerca de los 532 nm, siendo similar al obtenido en el presente trabajo que fue de 532.7 nm.

De igual manera, la máxima absorbancia reportada por los mismos autores para el estándar negativo fue a los 558 nm; misma que coincide con lo obtenido en las mediciones realizadas

.

Ambas longitudes de onda pueden ser reexaminadas con la finalidad de corregir las pequeñas variaciones que puedan existir dependiendo del instrumento utilizado. (Susuki et al, 2002). En nuestro caso, se realizaron varias mediciones para con ellas obtener un promedio de cada longitud de onda y así, de acuerdo a la particularidad de nuestro equipo de espectrofotometría UV/Vis se identificaron las dos longitudes de onda exactas para iniciar las mediciones.

De igual forma, los autores Theodore J. Siek y Frederick Rieders utilizaron este punto isosbético para la determinación de carboxihemoglobina en sangre cuando

se encuentra en combinación con otros pigmentos de hemoglobina en sangre mediante espectrofotometría UV/Vis.

Para comprobar la validez del método es necesario realizar su validación a través de parámetros específicos como son: repetibilidad, reproducibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad y especificidad, entre otras.

En la universidad de São Paulo, dentro de la facultad de ciencias farmacéuticas se realizó un estudio para la determinación de COHb mediante un método espectrofotométrico. Concluyendo que la cantidad de hemoglobina y de lípidos en la sangre no interfiere con la medición espectrofotométrica de la COHb, por lo que es altamente selectivo. (Malheiros et al, 1998).

Esto se comprobó al considerar que en una muestra hemática proveniente de un cadáver en estado de putrefacción, que presenta grandes cantidades de grasa, no afectó la medición de COHb, que fue de aproximadamente 60%.

La determinación de factores de calibración específicos para el espectrofotómetro (ESTÁNDAR) es necesaria para obtener resultados confiables. (Malheiros et al, 1998).

En un método en donde interfieren diversos factores, es necesario considerar todas las variables que puedan afectar el resultado. Existen causas por las cuales la medición puede no llevarse a cabo de manera correcta, como lo es un mal pipeteo, una incorrecta preparación de reactivo, etc. Por lo que es de suma importancia tomar todas estas consideraciones en cuenta.

10. CONCLUSIONES

- Es posible la preparación de controles positivos de referencia de COHb en sangre mediante la síntesis de CO en un laboratorio.
- Una vez estandarizado el método, se confirma que la espectrofotometría UV/Vis es adecuada para la cuantificación de la carboxihemoglobina en muestras de sangre y por lo tanto pueden resolverse casos de interés forense.

11. GLOSARIO

Dictamen. Opinión y juicio que se forma o emite sobre algo.

Peritos. Persona que, poseyendo determinados conocimientos científicos, artísticos, técnicos o prácticos, informa, bajo juramento, al juzgador sobre puntos litigiosos en cuanto se relacionan con su especial saber o experiencia.

Espectrofotometría. Es la técnica de análisis óptico basada en la propiedad física según la cual cada elemento en la naturaleza tiene un patrón de absorción de luz específico.

Radiación. Flujo de partículas o fotones con suficiente energía para producir ionizaciones en las moléculas que atraviesa.

Combustión. Reacción química entre el oxígeno y un material oxidable, acompañada de desprendimiento de energía y que habitualmente se manifiesta por incandescencia o llama.

Etiología. Estudio de las causas de las enfermedades.

Proteínas plasmáticas. Son las proteínas que se encuentran en el plasma sanguíneo

Glúcidos. Son biomoléculas formadas básicamente por carbono, hidrógeno y oxígeno. Se les suele llamar hidratos de carbono o carbohidratos.

Polipéptidos. Son un tipo de moléculas formadas por la unión varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

Anemia hemolítica. La anemia es una afección en la cual el cuerpo no tiene suficientes glóbulos rojos sanos que provean oxígeno. En la anemia hemolítica, los glóbulos rojos en la sangre se destruyen antes de lo normal.

Lecho ungueal. Área modificada de la epidermis situada debajo de la uña, sobre la cual se desliza esta al crecer.

Absorbancia. La parte luz que absorbe un cuerpo cuando un haz de luz incide sobre dicho cuerpo.

Hemólisis. Es la descomposición de los glóbulos rojos.

Coadyuvar. Contribuir, asistir o ayudar a la consecución de algo.

Forense. Adscrito a un juzgado de instrucción y que se dedica a cuestiones legales, como determinar las causas de muerte.

Espectrofotómetro. Es un instrumento que mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra, y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra.

Reproducibilidad. Se refiere a la capacidad que tenga una prueba o experimento de ser reproducido o replicado

Estadígrafo. Medida de resumen que permite hallar un valor numerico representativo de toda la poblacion o muestra en estudio.

Oxidación. Es una reacción química donde un metal o un no metal cede electrones, y por tanto aumenta su estado de oxidación.

Microdifusión. Es un procedimiento muy útil para aislar e identificar tóxicos volátiles, pudiendo aplicarse a muestras de sangre, orina y saliva.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Álex Merí, (2005), fundamentos de fisiología de la actividad física y el deporte. Editorial Médica Panamericana. Páginas: 37 - 41
2. Alina Yasmín Jiménez Castillo, (2004), Curso de Criminalística. Disponible en: <http://www.mailxmail.com/curso-criminalistica/definicion-actual-criminalistica>
3. Ana Cristina C. Gabriel da Costa Malheiros, Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira, Edna Maria Alvarez-Leite, (1998). Studies on spectrophotometric method for carboyhemoglobin determination
4. Andros Corral Payá, (2006). Fundamentos y funciones de la espectrometría de masas, Universidad de valencia facultad de farmacia departamento de química analítica. Disponible en: <http://mural.uv.es/cal oan/>
5. Antonio Vargas Sabadías, (1995). Estadística descriptiva e inferencial. Editorial Ciencia y Técnica. Páginas: 542 - 543
6. Bev – Lorraine True, Robert H. Dreisbach, (2003). Manual de toxicología clínica de Dreisbach: prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Manual moderno. Páginas: 264 - 268
7. Claudia Rosana Gral, Natalia Silvina Pasotti, (2006). Espectrofotometría visible – ultravioleta. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/8553130/Espectrofotometria>.
8. Cristina Giannini, Roberta Roani, (2003). Diccionario de restauración y diagnóstico. Editorial Nerea. Páginas: 85

9. D. Pérez Bendito, F. Pino Pérez, (1983) Análisis de elementos-traza por espectrofotometría de absorción molecular uv-visible, editorial San Pablo.
Páginas: 123 - 124
10. David C. Dugdale, (2009) Division of General Medicine, Department of Medicine, University of Washington School of Medicine.
11. David G. Penney, (2008). Carbon monoxide poisoning, Editorial Taylor and Francis
12. Denise Choussy Cáceres, (2004). Estudio de una tecnología para el reciclaje de los componentes de baterías de Ni- Cd, Tesis profesional de la Universidad de las Américas Puebla.
13. Dennis V. Canfield, Moraine Smith, Roxane M. Ritter, and Arvind K. Chaturvedi, (1999). Preparation of Carboxyhemoglobin Standards and Calculation of Spectrophotometric Quantitation Constants. Journal of Forensic Sciences.
14. Dr. José A. Sánchez Sánchez, (2009). Cadáveres quemados. Estudio antropológico-forense, Escuela de Medicina Legal de Madrid.
15. Eugene D. Olsen, (1990). Métodos ópticos de análisis, Editorial Reverté.
Páginas: 87 - 88
16. Facultad de ciencias exactas-UNLP, departamento de ciencias biológicas, (n.d.) Disponible en:
http://www.biol.unlp.edu.ar/toxicologia/guiastp/guia_tp1/monoxido_carbono.html

17. Harold F. Walton, Jorge Reyes, (2005). Análisis químico y cuantitativo moderno. Editorial Reverté. Páginas: 146
18. Hobart H. Willard, (1983). Métodos instrumentales de análisis. Editorial Continental
19. Isabel Sierra Alonso, Damián Pérez Quintanilla, Santiago Gómez Ruiz, Sonia Morante Zarcero, (2010). Análisis instrumental, algunas herramientas de enseñanza-aprendizaje adaptadas al Espacio Europeo de Educación Superior. Editorial Netbiblo. Páginas: 42 - 43
20. Jain, (1990), Carbon monoxide poisoning, Ed. Warren H. Green. Inc. Página: 377
21. John E. Duldner, (2009). Department of Emergency Medicine, Samaritan Regional Health System.
22. José M. Nicolás, Javier Ruiz, Xavier Jiménez, Alvar Net, (2011). Editorial Elsevier, Página: 48
23. Juan Antonio Gisbert Calabuig. (1998). Medicina legal y toxicología Barcelona España, Editorial Masson, S.A
24. Juventino Montiel Sosa, (1993). Criminalística tomo 1 México. Editorial Limusa Noriega editores. Páginas: 19 - 48
25. Kojima T, Nishiyama Y, Yashiki M, (1981) Determination of carboxyhemoglobin saturation in blood and body cavity fluids by carbon monoxide and total hemoglobin concentrations.

26. Leo R. Goldbau, Donald H. Chace, and Nicholas T. Lappas, (1986). Determination of Carbon Monoxide in Blood by Gas Chromatography Using a Thermal Conductivity Detector. Journal of Forensic Sciences
27. Lewis, R.L., Johnson, R.D. and Canfield, (2002). An accurate method for the determination of carbon monoxide in postmortem blood using gc/tcd
28. Malena González Eichenberg, (2003). Monóxido de carbono. <http://cienciaforense.com/Pages/Toxicologia/MonoxidodeCarbono.htm>
29. Sharon Parmet, MS. (2002). Intoxicación por monóxido de carbono.[versión electrónica] The Journal of the American Medical Association
30. Marian Fierro, (2000). Carbon monoxide (CO)
31. Martha Franco de Ambriz, (2002). Hematología forense. Editorial Porrúa
32. Miguel Ángel Sogorb Sánchez, Eugenio Vilanova Gisbert, (2004). Técnicas analíticas de contaminantes químicos. Editorial Diaz de Santos. Páginas: 76 - 77
33. Nora Brandan, (2008). Cátedra de bioquímica – Facultad de Medicina UNNE Disponible en: <http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/hemoglobina.pdf>
34. Osamu Susuki, kanako watanabe. (2002) Drugs and poisons in humans A handbook of practical analysis. Tokyo Japón. Editorial Springer
35. Reyes Calderón José Adolfo. (1998). Tratado de criminalística. México: Cárdenas Velasco Editores

36. Stuart H. James, Jon J. Nordby, (2005). An introduction to scientific and investigative techniques. Editorial Taylor and francis. Páginas: 70 - 71
37. Todd Sanford, (1981). Diagnóstico clínico por el laboratorio. Editorial Salvat editores S.A. Páginas. 107 - 118, 697 - 700
38. Thomson Gale, (2006). Carbon Monoxide from *World of Chemistry*.
39. Wilbert Adolfo Villegas Casares, Pablo Óscar Acereto Escoffié, Mimí Elizabeth Vargas, (2006). Análisis ultravioleta-visible. Editorial Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Páginas: 39 - 40
40. Yoshinao Katsumata, Minoru Aoki, Keizo Sato, Osamu Suzuki, Masakazu Oya, Shoichi Yada, (1982). A Simple Spectrophotometry for Determination of Carboxyhemoglobin in Blood: Journal of Forensic Sciences